



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Especiación en el género *Drosophila*: efectos
sobre la *fitness* de introgresiones cromosómicas estables de
D. koepferae en *D. buzzatii*

Luis Carlos Rodríguez López

Tesis de doctorado UDC / 2015

Director/Tutor: Horacio Naveira Fachal

Departamento de Bioloxía Celular e Molecular

*A mi familia, lo que más quiero,
especialmente a los que ya no están,
pero siempre me acompañan.*

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin la sabiduría de mi director, el doctor D. Horacio Naveira Fachal y nunca se hubiera realizado sin su ánimo y afecto, su cariño y paciencia hacia mí. El mayor agradecimiento se quedaría corto y hay que sumarle mi admiración, respeto y una profunda amistad.

Tampoco sería posible haber completado esta investigación sin la enorme paciencia y generosidad de mi familia, condicionando muchas veces sus prioridades a las exigencias del laboratorio. Soportaron mis malos momentos y me empujaron a continuar una y otra vez. Nada se habría hecho sin ellas.

No puedo olvidar tampoco a los doctores José Barral, Xulio Maside y Antonio Carvajal, que me aceptaron en el grupo y me integraron, creando un ambiente feliz de trabajo que muy pocas veces se encuentra. También me enseñaron a andar en este mundo por un camino que aún sigo recorriendo.

Nombrar al resto de personas que me han ayudado sería más largo que el propio texto por lo que espero que se sientan citadas. Sé que ellas saben que no olvido sus magníficas aportaciones y que deseo corresponderles en el futuro como se merecen.

ÍNDICE

RESUMEN.....	13
---------------------	-----------

INTRODUCCIÓN	17
---------------------------	-----------

LA ESPECIE Y SUS PARADOJAS.....	20
DESCRIPCIÓN DE ESPECIES	23
Diferenciación específica	25
EL CICLO VITAL DE DROSOPHILA	29
LOS CROMOSOMAS POLITÉNICOS	37
DETERMINACIÓN DEL SEXO Y COMPENSACIÓN DE DOSIS	39
FORMACIÓN DE NUEVAS ESPECIES	42
MODELOS DE ESPECIACIÓN.....	44
DESARROLLO DE INCOMPATIBILIDADES	47
Efectos mayores <i>versus</i> menores	48
La hipótesis “snowball”	50
Regla de Haldane.....	50
Efecto mayor del cromosoma X	52
Crisis de la F ₂	52
EXPRESIÓN DE LAS INCOMPATIBILIDADES	54
Inviabilidad y esterilidad híbrida	54
Alteraciones en el desarrollo	59

OBJETIVOS.....	63
-----------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
--------------------------------	-----------

POBLACIONES Y CEPAS UTILIZADAS	69
MEDIOS DE CRÍA.....	71
TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN	72
TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN	73
Sexado	73
Observación de cromosomas politénicos	73

Observación de genitales	74
<i>ESTUDIO DEL CORTEJO</i>	76
<i>OBTENCIÓN DE CRUZAMIENTOS HÍBRIDOS F1</i>	78
<i>OBTENCIÓN DE LÍNEAS HOMOCIGOTAS</i>	80
<i>ESTUDIO DE LA FERTILIDAD</i>	86
<i>ESTUDIO DE LA RATIO SEXUAL</i>	89
<i>ESTUDIO DE LA PRODUCTIVIDAD</i>	92
<i>ESTUDIO DEL DESARROLLO</i>	95

RESULTADOS	99
-------------------------	-----------

<i>CORTEJO</i>	101
Comportamiento general.....	101
Proporción de cópulas.....	101
Comienzo de la cópula.....	102
Duración de la cópula	105
Resumen del apartado	107
<i>OBTENCIÓN DE CRUZAMIENTOS HÍBRIDOS</i>	108
Selección de fragmentos	108
Obtención de líneas.....	109
<i>ESTUDIO DE LA FERTILIDAD</i>	112
Formación de esperma	112
Atrofia testicular	121
Resumen de resultados del apartado	123
<i>ESTUDIO DE LA RATIO SEXUAL</i>	124
Diferencias de ratio sexual.....	124
Caracterización temporal.....	131
Cuantificación	132
Causalidad.....	136
Letales <i>pseudoequilibrados</i>	139
Resumen de resultados del apartado	142
<i>ESTUDIO DE LA PRODUCTIVIDAD</i>	143
Diferencias de productividad entre series	143
Efectos sobre la proporción sexual	149

Diferencias entre categorías	152
Resumen de resultados del apartado	154
ESTUDIO DEL DESARROLLO.....	155
Tipología	155
Fijación	167
Cuantificación	168
Resumen de resultados del apartado	174

DISCUSIÓN.....177

El aislamiento precigótico entre <i>D. buzzatii</i> y <i>D. koepferae</i>	180
Geografía genética de las incompatibilidades	182
Diferencias entre autosomas y cromosomas sexuales	183
La esterilidad y el retraso de la formación del esperma	184
Inviabilidad y la caída de <i>fitness</i> general.....	186
Anomalías del desarrollo	190
Integración de procesos	194

CONCLUSIONES.....201

BIBLIOGRAFÍA.....205

ANEXO.....219

Cortejo.....	220
Ratio sexual.....	221
Esterilidad	224
Productividad	226
Alteraciones del desarrollo	229

RESUMEN

Resumen

El estudio de las causas genéticas de la incompatibilidad entre dos especies usando híbridos es un planteamiento clásico, pero nuestra propuesta es bastante poco frecuente. En este trabajo conseguimos híbridos transgénicos que llevan fragmentos cromosómicos en homocigosis de *Drosophila koepferae* en un fondo genético de *Drosophila buzzatti*. Tras esto testamos las principales manifestaciones de los problemas de *fitness* en los híbridos: la esterilidad, la inviabilidad y las alteraciones del desarrollo. Encontramos efectos severos que responden principalmente a la arquitectura genética y a la cantidad de cromosoma introgresado, con sólo dos regiones que podrían albergar genes de efecto mayor. Determinamos un umbral para la esterilidad que se corresponde con estudios anteriores, demostramos que la inviabilidad mediada por efectos maternos puede ser la principal causa de distorsión de la ratio sexual y observamos alteraciones del desarrollo de muy baja penetrancia y expresividad variable en todas y cada una de las cepas de híbridos estables estudiadas. Esto sugeriría incompatibilidades genéticas de naturaleza poligénica generalizada entre nuestras especies, más que específicas y localizadas. Existe un paralelismo entre las alteraciones observadas en el desarrollo de los híbridos con las producidas por mutaciones en genes específicos de apoptosis o reguladores del desarrollo en *Drosophila*.

Resumo

O estudo das causas xenéticas da incompatibilidade entre dúas especies empregando híbridos é un plantexamento clásico, máis a nosa proposta é bastante inusual. Neste traballo conseguimos híbridos transxénicos que levan anacos de cromosoma en homocigosis de *Drosophila koepferae* nun fondo xenético de *Drosophila buzzatti*. Logo disto testamos as principais manifestacións dos problemas na *fitness* dos híbridos: a esterilidade, a inviabilidade e as alteracións no desenvolvemento. Atopamos fortes efectos que respostan maiormente á arquitectura xenética e a cantidade de cromosoma introgresado, con so dúas rexións que poderían acoller xenes de efecto maior. Determinamos un limiar para a esterilidade que se corresponden con estudos anteriores, demostramos que a inviabilidade mediada por efectos maternos pode ser a principal causa de distorsión na ratio sexual, e observamos alteracións do desenvolvemento de moi baixa penetrancia e expresividade variable, máis en todas e cada unha das clases de híbridos estables. Isto suxiriría incompatibilidades xenéticas de natureza polixénica xeralizada, máis que específicas e localizadas. Existe un paralelismo entre as alteracións observadas no desenvolvemento dos híbridos coas producidas por mutacións en xenes específicos de apoptosis ou reguladores do desenvolvemento en *Drosophila*.

Abstract

The study of the genetic causes of the incompatibility between two species using hybrids is a classical approach, but our proposal was quite unusual. In this work we achieved transgenic hybrids carrying *Drosophila koepferae* chromosomal homozygotic fragments in a *Drosophila buzzatti* genetic background. After that we tested the main hybrid *fitness* problems: inviability, sterility and developmental disorders. We found serious effects depending mainly on genetic architecture and amount of introgressed chromosome, with only two regions that could contain major effect genes. We established a threshold for sterility in agreement with other studies and demonstrated maternal effects as the probably main cause for sexual ratio distortion. We saw developmental disorders with a low penetrance and variable expressivity, but in every kind of hybrid studied. This could point to general polygenic incompatibilities between these species, more than specific and located ones. There are similarities between our hybrid developmental disorders and those produced for apoptosis or developmental regulators gen-specific mutations in *Drosophila*.

INTRODUCCIÓN

En el siglo y medio transcurrido a partir de la publicación del “Origen de las especies” de Charles Darwin la visión científica general ha variado fundamentalmente. Hoy en día no se conciben procesos absolutos e inmutables si no que todo es variación, evolución o ciclo. Prácticamente todas las disciplinas científicas en sus teorías de unificación plantean una filosofía del cambio: el Universo se genera en una explosión y evoluciona, las estrellas nacen, mueren y generan otros objetos estelares; las rocas siguen ciclos que las transforma y las convierte de nuevo en la roca original; los continentes se mueven y modifica su forma y hasta nos hemos acostumbrado a oír hablar de evolución de índices y ciclos económicos.

Este principio fundamental se lo debemos a un entorno científico que sustituyó la mera descripción por la búsqueda de explicación de los procesos naturales y que inevitablemente lleva a ideas de transformación. La Ciencia trascendió para impregnar la sociedad entera y la línea de pensamiento a todos los niveles: todo es cambio, todo es adaptable y las condiciones que rodean a cualquier proceso son capitales en su desarrollo. Nada es mejor ni peor en grado absoluto, todo depende de dónde se encuentre.

Participa y contribuye a todo esto las teorías de evolución biológica, cuyos mecanismos parten de unidades que llamamos especies y que agrupan a los individuos que cambian juntos. La especie a su vez, y como entidad, también siguen un ciclo de formación, cambio y desaparición.

Este trabajo intenta hacer una aportación al conocimiento de los elementos y efectos que producen las incompatibilidades genéticas desarrolladas en el proceso de especiación. Para ello utilizamos dos especies cercanas del género *Drosophila*, concretamente *Drosophila buzzatii* y *Drosophila koepferae*. Intentamos una visión de conjunto del organismo completo, centrados en el efecto sobre la *fitness* general de híbridos entre ambas especies, tomando como referencia a las especies originales.

Nuestro acercamiento ha seguido una metodología conscientemente clásica pretendiendo un humilde homenaje a los padres de la Genética, pero con el apoyo de las investigaciones de los científicos moleculares actuales.

LA ESPECIE Y SUS PARADOJAS

La especie está reconocida como una de las unidades básicas de la biología, comparable en importancia con otras como genes, células u organismos (DeQueiroz, 2007). Pese a la aparente obviedad de esta afirmación, cuando un investigador intenta acotar su sentido aparecen paradojas.

La primera surge con el propio concepto, históricamente esquivo y hasta polémico. Su significado ya es de partida dual: por un lado es una jerarquía de origen linneano y por otro es un grupo natural sometido a las leyes de la evolución (Llorente, 2000)

Por otro lado existe una necesidad práctica de clasificación de los seres vivos en unidades distinguibles. Dependiendo de los datos de los que disponga el investigador se han planteado múltiples definiciones, frecuentemente *ad hoc*. Las distintas orientaciones de estas propuestas están provocadas por varias causas, entre otras:

1. Existe una tradición histórica nominalista/tipológica que sesga hacia una cierta visión estática el concepto, producida por la necesidad de reconocimiento directo del organismo mediante criterios morfológicos de observación más o menos rígidos
2. Concorre la necesidad de realizar una clasificación partiendo de una colección de datos con una naturaleza determinada, frecuentemente incompletos y que obligan a diseñar paralelamente a la categorización los propios elementos de juicio
3. Los procesos evolutivos de formación de especies suelen abarcar una gran cantidad de tiempo, pero pretendemos comprenderlos desde nuestra muy limitada mirada temporal, provocando un desenfoque de los límites y una insuficiencia de datos.
4. Aunque una especie es una unidad concreta también está sujeta al omnipresente cambio y surge en un momento concreto, se mantiene durante un tiempo, produce o no nuevas especies y por último se extingue. Todo ello en tiempos y motivos variables dependiendo de una multiplicidad de factores entre los que el propio azar juega un importante papel. Además las especies se definen por sus barreras que a su vez progresan gradualmente por evolución. ¿Cómo centrar la mirada en procesos en marcha y ser preciso en una definición concreta?

Esas son las causas de la gran cantidad de enunciados registrados a lo largo de la historia: once (DeQueiroz, 2007), veintidós (Mayden, 1997), veinticuatro (Mayden, 1999) aunque el mayor número encontrado entre las recopilaciones revisadas ha sido de treinta y cuatro (Llorente, 2000). A efectos de claridad preferimos la agrupación que hace Mayr (Mayr, 1992) en cuatro categorías de lo que realmente es una especie:

- Concepto tipológico: entidad que se diferencia de otras especies por unas características diagnósticas constantes. Aunque es la más longeva históricamente presenta la dificultad de enfrentar problemas como la agrupación de subpoblaciones o poblaciones locales y de especies crípticas, indistinguibles morfológicamente pero aisladas reproductivamente, como son las que estudiamos en este trabajo.

- Concepto nominalista: las especies serían construcciones mentales arbitrarias y subjetivas. De raíz más bien filosófica, también resulta inaplicable en un entorno científico actual
- Concepto evolutivo: sería un linaje (secuencia de poblaciones ancestro-descendientes) que evoluciona separadamente de otros linajes y que tiene su propio papel evolutivo y tendencias (Simpson, 1961). Útil para estudios paleontológicos pero con dificultades para discernir poblaciones aisladas de una especie y determinar el momento de origen o fin de una especie en el tiempo (Mayr, 1992)
- Concepto biológico: Grupos de poblaciones naturales, genéticamente similares y con intercambios genéticos, interfértiles y aisladas reproductivamente de otros grupos análogos. (Mayr, 1992) Este último es el más extendido y menos artificioso, pese a sus limitaciones de aplicación en individuos sin reproducción sexual, en especies con capacidad de hibridación y su necesidad de simpatría y sincronía, lo que la hace inútil a efectos de filogenia (Llorente, 2000)

Añadiremos dos de especial relevancia que Mayr no señala, ambas relacionadas con la integración de la especie en su ambiente:

- Concepto ecológico: Un linaje (o conjunto de ellos) que ocupa una zona adaptativa mínimamente diferenciada de la de cualquier otro linaje de su rango, y que evoluciona separadamente a todos los linajes externos a su rango. (Llorente, 2000)
- Concepto de *fitness* diferenciada: grupo de individuos poseedores de unas características que tendrían efectos negativos en la *fitness* de otros grupos y que, por tanto, no pueden ser regularmente intercambiados. (Hausdorf, 2011)

La otra gran paradoja, casi contradicción, proviene del hecho de que el cambio biológico necesita el flujo génico que se consigue con la reproducción. Este es el mecanismo por el que una característica o combinación positiva surge o se muestra beneficiosa en un ambiente concreto y se va extendiendo, generación tras generación por una determinada población. Sin embargo, la adaptación a distintos ambientes obliga a mecanismos de formación de unidades evolutivas sin flujo génico entre ellas, es decir especies. El desarrollo de estas barreras es el proceso de especiación objeto de este trabajo y resulta por lo menos curioso que lo que es un proceso de compartimentación biológica se origine a partir de otro que favorece la máxima mezcla y dispersión de características entre los seres vivos.

Asumiendo el concepto biológico de especie e intentando estudiar genéticamente el proceso que lleva a que dos poblaciones se aislen y terminen formando dos especies nos encontramos de salida con una dificultad capital:

“...problema metodológico obvio: el estudio genético de la especiación es, casi por definición, el intento de hacer genética donde no puede ser realizada, es decir, entre especies”
(Orr, 2004)

No podemos cruzar dos especies, por lo que es complejo conocer dónde y cómo han evolucionado sus diferencias. Además, los híbridos entre especies cercanas suelen tener problemas de esterilidad o inviabilidad (Haldane, 1922; Presgraves, 2007). Por eso la mayoría de los estudios, incluido el presente se focalizan en las incompatibilidades entre este tipo de especies por lo que *stricto sensu* no estudian la especiación, si no discrepancias que son asumidas como producto del proceso de separación. Otra línea en

las investigaciones consiste en fijarse en poblaciones separadas de la misma especie y haciendo las mismas asunciones considerar que sus desigualdades son desencadenadas por una especiación incipiente.

Sea como sea no se ha observado hasta el día de hoy que los mecanismos que controlan el cambio evolutivo estén en desavenencia con los que provocan la especiación, por lo que podemos asumir que en efecto estamos haciendo un acercamiento objetivo a la realidad de un proceso complejo y de capital importancia.

Para solventar estas preguntas se han realizado desde hace más de un siglo multitud de estrategias experimentales, aunque la mayoría de ellas podrían agruparse en dos acercamientos, no excluyentes y mutuamente complementarios:

- **Molecular:** consiste en analizar secuencias de ADN o productos génicos en las dos especies y compararlos. Permite filogenias y detección de posibles incompatibilidades, pero no se muestra tan resolutivo en procesos de epistasis o poligénicos en general.
- **Hibridación:** consiste en la utilización de poblaciones aisladas de una misma especie, o más frecuentemente, de especies que por su cercanía genética permiten todavía un cruzamiento forzado que origina una serie de problemáticas en la descendencia que se analizan y asignan a zonas cromosómicas. De su análisis se deducen interacciones génicas y efectos sobre los individuos, pero es complicada la asignación de un efecto a un gen concreto.

DESCRIPCIÓN DE ESPECIES

Nuestro trabajo se engloba dentro de los estudios de hibridación, intentando modestamente aportar datos de análisis a la problemática de las barreras existentes entre dos especies. Como ya citamos, utilizamos las especies gemelas *D. koepferae* y *D. buzzatii*. No se han encontrado híbridos en la naturaleza y la obtención del cruce en el laboratorio no es fácil y en cualquier caso resulta complicada y de muy baja eficacia.



Podría pensarse entonces que la elección no es la correcta y que sería más apropiado usar especies que la bibliografía muestra como más sencillas para la obtención de híbridos, como son las del grupo *melanogaster*. Pero el cluster *Drosophila buzzatii* tiene una serie de características que lo hacen interesante para su estudio como es su carácter monofilético (Oliveira, 2012), utilizable en estudios de evolución comparada. Otras posibilidades que presentan son la cantidad de información genética y ecológica asociada a la distribución geográfica, con restricciones ambientales que permiten una localización y determinación de las especies en un entorno natural y con una relativamente baja diversidad taxonómica, lo que permite contrastar con relativa facilidad test evolutivos a niveles intra e interespecíficos (Manfrin, 2006). Apoya también esta selección el hecho de que los híbridos de ambas especies presentan asinapsis en el apareamiento de sus cromosomas homólogos, permitiendo localizar citogenéticamente de manera precisa la posición cariotípica y el tamaño del fragmento de la especie donadora (Naveira, 1986). Si sumamos la reciente conclusión de la secuenciación del genoma de *Drosophila buzzatii* (*Drosophila buzzatii* Genome Project <http://dbuz.uab.cat>) y que en el proceso de especiación podríamos situarlas entre especies más cercanas y aquellas en las que el aislamiento es tal que ningún cruzamiento es posible podemos concluir que la elección realizada permitir comparar adecuadamente datos asimilables a lo ocurrido a lo largo del progreso de formación de las barreras interespecíficas

Drosophila koepferae (Fontdevila y Wassermann, 1988) y *Drosophila buzzatii* (Patterson & Wheeler, 1942) pertenecen taxonómicamente al cluster *Drosophila buzzatii*, que junto a los cercanos clusters *D. stalkeri* Wheeler y *D. martensis* Wasserman y Wilson constituyen el complejo *Drosophila buzzatii*. A su vez este complejo es parte del subgrupo *mulleri* del grupo *repleta* del género *Drosophila* (*Drosophilidae*, *Diptera*)

La mayoría de las cien especies del grupo *repleta* son cactofílicas, aunque también existen otras especializaciones alimentarias y ecológicas. Su radiación es paralela a la de sus especies de cactus sustentantes con un origen geográfico que parece ser Sudamérica, de la que se extendería por el istmo de

Panamá a Centroamérica, el Caribe y el resto de Norteamérica. Se considera que la separación respecto a su grupo más cercano ocurrió hace 21 millones de años, diversificándose intragrupalmente hace 16 millones de años. La mayoría de los subgrupos principales ya habían surgido en el Mioceno medio, entre 12 y 15 millones de años (Oliveira, 2012). De ellos, el subgrupo *mulleri* presentaría un carácter monofilético, con una línea basal que correspondería al complejo *meridiana* del que se desprendería primariamente el complejo *buzzatii*., y de él los complejos *mulleri* (11,3 millones de años) y *longicornis*.

El complejo *buzzatii* presenta un cariotipo politénico básico común: cinco pares de autosomas, de los cuales cuatro son acrocéntricos de más o menos igual longitud y un par de pequeños dot; un X también acrocéntrico y de longitud similar a los autosomas, y un Y que no politeniza. Se pueden diferenciar las distintas especies del complejo estudiando sus polimorfismos de inversión situadas a lo largo de los distintos cromosomas. Filogenéticamente el complejo comparte una reordenación cromosómica ancestral Xabc; 2ab; 3b; 4R; 5R que mantiene *D. martensis*, el cluster *Drosophila buzzatii* sería el intermedio, diferenciándose por cuatro inversiones 5g, 2m, 2n y 2z (Ruiz, 1993) y *D. stalker* estaría en el otro extremo evolutivo (Manfrin, 2006).

Este cluster *Drosophila buzzatii* consta de siete especies y además de las dos ya citadas incluye a *D. serido* Vilela y Sene, *D. seriema* Tidon-Sklorz y Sene, *D. borborema* Vilela y Sene, *D. gouveai* Tidon-Sklorz & Sene y *D. antonietae*. Tidon-Sklorz & Sene (Tidon-Sklorz, 2001; Machado, 2006). En trabajos anteriores al 2001 estas dos últimas especies se pueden encontrar como *D. sp D* y *D. sp B* (Machado, 2002) no descritas totalmente o morfotipos D y B de *D. serido*. (Manfrin, 2001). Algo similar ocurre con la propia *D. koepferae*, en trabajos anteriores a 1988 se la consideraba una variante argentina de *D. serido*, aunque el propio Wasserman, uno de los autores que la describieron como especie en ese año, ya apreciaba anteriormente divergencias entre las variantes argentina y brasileña (Wasserman, 1983) Las diferencias entre las distintas especies del grupo se basan fundamentalmente en la morfología del aedeagus (órgano copulador) y en sus distintas reordenaciones cromosómicas respecto a la original común.

Existe una cierta controversia sobre su filogenia interna dependiendo del tipo de datos que se utilicen: favorables a una agrupación de las dos especies que nosotros estudiamos separadas del resto serían los estudios de ADN mitocondrial (Manfrin, 2001), así como aspectos morfológicos respecto al color y forma del terguito (Manfrin, 2006) y la composición de los hidrocarburos cuticulares que previenen de la desecación y sirven de reconocimiento sexual y específico (Oliveira, 2011). La morfología general del aedeagus (Soto, 2007), ciertos marcadores genéticos nucleares (Xdh y satADN) (Piccinali, 2004) y la morfología del ala (Manfrin, 2006) engloba a *D. koepferae* con el grupo de *D. serido*, *D. gouveai*, *D. seriema* y *D. antonietae*. Pruebas de cruzamiento interespecífico adoptan una postura intermedia: separan a *D. koepferae* del resto sin acercarla a *D. buzzatii* (Machado, 2006)

Podemos situar geográficamente al cluster en la “diagonal seca” de Sudamérica, que comprende una zona en el noreste de Brasil, gran parte de la zona oeste argentina pegada a los Andes, el sur de Bolivia, el oeste y el centro de Paraguay y un estrecho corredor en el Mato Grosso brasileño. Toda la zona tiene un clima semiárido, con asociaciones vegetales que van desde la sabana hasta bosques cerrados. Lo que si es muy característico es la presencia de gran diversidad de especies de cactus, sobre todo en los dominios de Caatinga (Brasil) y el Chaco (mayormente Argentina) (Oliveira, 2011). En las zonas adyacentes de bosque también se encuentran cactus asociados a zonas rocosas de altura o arenosas, indicando una posible retracción en el pasado de su distribución (Manfrin, 2006)

La diferenciación evolutiva del conjunto está sujeta también a discusión dependiendo del tipo de datos que analicemos. Tradicionalmente se considera que los cambios climáticos y de vegetación asociados a las glaciaciones cuaternarias serían los responsables del aislamiento de las especies del *cluster*, pero se deben señalar los datos de ADN mitocondrial (Manfrin, 2001) que indicarían un escenario de aislamiento anterior, con una primera divergencia hace 6-12 millones de años de *Drosophila koepferae* y *Drosophila buzzatii* respecto a las otras cinco especies y de 4'6 millones de años (en un rango de entre 4 y 5) entre ellas (Gómez, 2003; Manfrin, 2006; Soto, 2007; Oliveira, 2012; Fontdevilla, 2014; Morán, 2014) ..

Parece ser que el género *Opuntia* fue el hospedador original del grupo, pero que existió una diferenciación de nichos hacia un desarrollo en cactus columnares. Oliveira *et al* señala esta transición en hasta diez fases (Oliveira, 2012). Episodios anteriores o posteriores de fragmentación probablemente asociados a contracciones y expansiones geográficas en el vegetal de alimentación preferente hayan sido los factores que contribuyeron al aislamiento y al proceso de separación específica del *cluster* (Oliveira, 2011). Refuerza esta hipótesis el hecho de que se hayan encontrado patrones similares de discontinuidad de variación y endemismos en otras especies de insectos, plantas y animales (Manfrin, 2006)

Diferenciación específica

Nuestras dos especies son consideradas crípticas, por lo que para distinguirlas entre ellas y con el resto del *cluster* existen diferencias diagnóstico de tipo morfológico, ecológico, cromosómico y fisiológico:

Características morfológicas

La primera diferencia es anatómica y se refiere a la morfología del aedeagus, pequeño órgano quitinoso encargado de introducir el esperma en la vagina de la hembra y que en artrópodos evoluciona con altas tasas, lo que le permite ser un carácter diagnóstico muy útil. (Soto, 2007).

La imagen anexa permite ver las diferencias entre las dos especies en la que se aprecia el mayor tamaño del apodema y el diferente aspecto general del resto del órgano. *D. buzzati* muestra una forma y tamaño diferente al resto del *cluster*, mientras que *D. koepferae* presenta el llamado tipo E (Machado, 2006). Existe una cierta variabilidad en el tamaño en *D. buzzatii* dependiendo del tipo de alimentación: es mayor si se desarrolla en *Opuntia* y más

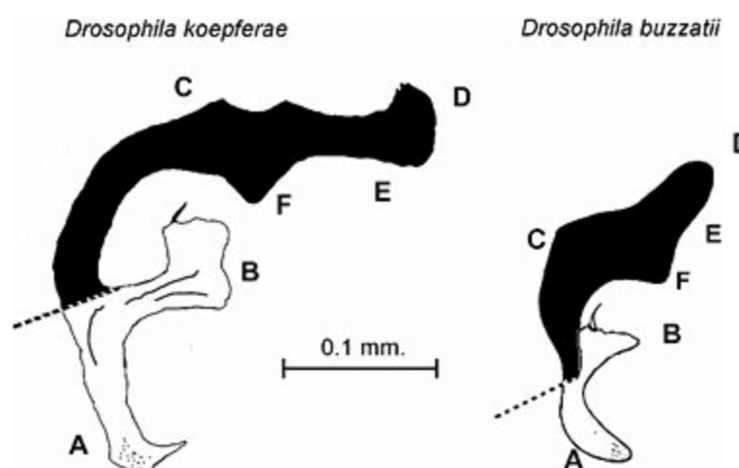


Fig 2 Representation of aedeagus in lateral view of *Drosophila koepferae* and *Drosophila buzzatii*. Black silhouette represents the portion of the organ included in the quantification of size and shape variation. A Aedeagal apodeme, B paraphysis, C dorsal margin, D tip, E ventral margin, F ventral process
Reproducción de Soto, 2012

pequeño si lo hace sobre *Trichocereus*. También existe una relación con el tamaño general del individuo. Estas diferencias no existen en nuestra otra especie. En cualquier caso y pese a las variables fenotípicas, una significativa parte de morfología tiene una base genética (Soto, 2007)

Hay que señalar en este punto los interesantes resultados obtenidos en las comparaciones interespecífica e intrapoblacionales de la misma especie (Soto, 2012). En estos estudios se observa una diferenciación intraespecífica del aedeagus de *D. buzzatii* según se encuentre en alopatria o simpatria respecto a *D. koepferae*. Parece ser que la prevención de la hibridación en coexistencia hace más pequeño y varía la curvatura del órgano, incrementando todavía más las diferencias morfológicas entre ambas especies y funcionando incluso como carácter diagnóstico poblacional. En híbridos interespecíficos de laboratorio la morfología del órgano es específica del cruce y no es intermedia, si no que se parece a una de las especies progenitoras (Soto, 2007).

Características ecológicas y fisiológicas

D. koepferae se restringe a la zona occidental del dominio El Chaco, en las laderas orientales de los Andes argentinos y bolivianos. *D. buzzatti* presenta una biogeografía solapante en El Chaco pero su distribución es más cosmopolita y se extiende por otras zonas de Argentina, Perú y Brasil, probablemente por eventos de expansión durante los períodos paleoclimáticos fríos/ secos y restricción en los cálidos/ húmedos (Machado, 2006). Datos moleculares que calculan la presencia de *D. buzzatti* en Brasil desde hace 100.000 años apoyan la hipótesis de que su origen es el dominio de El Chaco con extensión posterior hacia las zonas brasileñas (Manfrin, 2006). También se encuentra en otros lugares del mundo, pero en estos casos se considera una introducción humana asociada al cultivo de las chumberas *Opuntia ficus-indica* (Manfrin, 2001)

Sus preferencias alimentarias no sólo las distinguen sino que probablemente hayan sido la llave de su diferenciación al estar correlacionados positivamente los cambios de dieta al aislamiento reproductivo (Rova, 2011). Aunque ambas son especies cactófilas que se alimentan de tejidos necrosados de estos vegetales y pese a existir un cierto solapamiento de nichos y distribución, *D. buzzatti* se desarrolla preferentemente con mucha mayor viabilidad sobre chumberas del género *Opuntia* mientras que *D. koepferae* lo hace sobre cactus columnares *Cereus* y *Trichocereus*. (Wasserman, 1983; Fanara, 1999; Piccinali, 2004; Soto, 2014).

Esta diferencia no es menor porque además de la distinta distribución local existen disparidades en la composición química de las especies de cactus citadas. La radiación evolutiva de las cactáceas ha venido acompañada de su diferenciación química: las *Opuntia* presentan una mayor cantidad de agua y concentración de azúcares, mientras que los cactus columnares contienen triterpenos alcaloides de propiedades neurotóxicas e incluso mortales para otras especies de *Drosophila*, y que son utilizados precisamente como disuasores alimentarios. Esta diferencia, aparte de su efecto *per se*, condiciona la presencia de distintas levaduras y bacterias de las que se alimentan las larvas, influyendo en la *fitness* de la descendencia. *D. buzzatii* es afectada negativamente por la presencia de alcaloides, incrementando su tasa de inviabilidad y aumentando su tiempo de desarrollo, no afectando a *D. koepferae*. Está comprobado el hecho de que ambas especies tienen un desarrollo más rápido y mayor tasa de apareamiento en su huesped primario (Soto, 2014). La composición química también influye en la liberación de distintas sustancias volátiles que influyen en la atracción y posterior puesta de de huevos de las hembras reproductoras (Fanara, 1999).

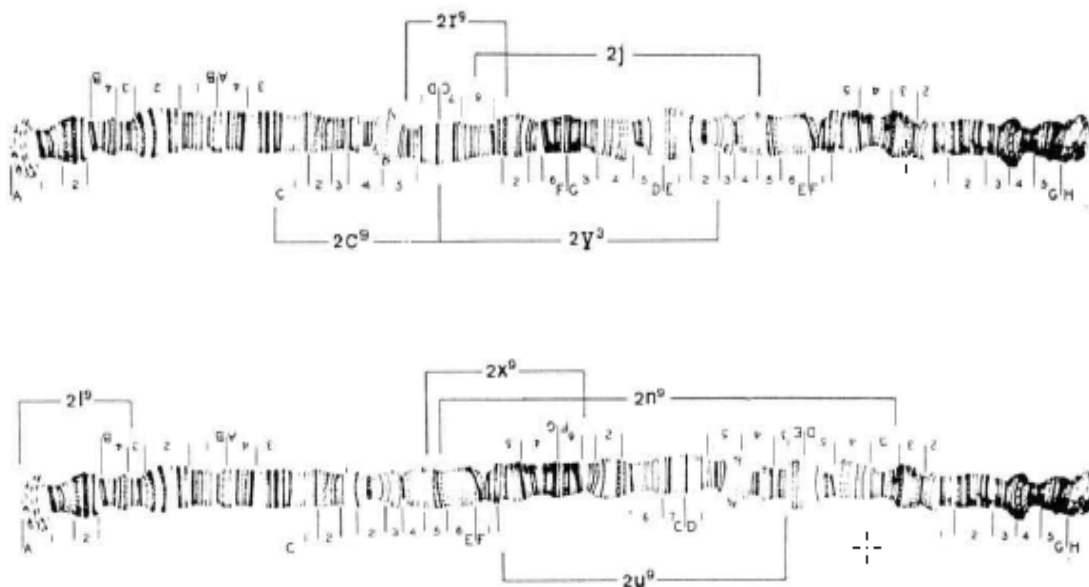
También existe variedad en la disponibilidad alimenticia: los cactus columnares constituyen una fuente de alimentación más estable porque los restos de sus troncos son mucho más grandes y se

descomponen más lentamente que los de las chumberas, aparte de que su complejidad química mayor podría alargar el proceso de descomposición. Esta mayor facilidad para obtener alimento puede ser la causa de que *D. koepferae* sea levemente más grande y tenga un período de desarrollo más lento que *D. buzzatii*. Todo el conjunto determina la presencia de hábitats distintos que explican la diferenciación específica. (Manfrin, 2006; Fanara, 2009)

Como resultado de estas diferencias ecológicas se deduce una estrategia más generalista en *D. buzzatii*, consistente con un uso más primitivo del hospedador al poder vivir tanto sobre *Opuntia* como en *Cereus*, si bien con una menor efectividad, frente a la más especializada *D. koepferae*, que ha desarrollado una adaptación al entorno más tóxico de los cactus columnares (Soto, 2014)

Características cromosómicas

El criterio de diferenciación de ambas especies por la ordenación cromosómica es de las más útiles en el diagnóstico de laboratorio, pues existen distribuciones características a partir de la ordenación común Xabc 2abmnz⁷ 3b del grupo, apareciendo la 5g en *D. buzzatii* y 2j⁹ en *Drosophila koepferae* (Ruiz, 1993)



Representaciones del cromosoma 2 de *D. buzzatii* (arriba) en una de sus ordenaciones y de *D. koepferae* (abajo)
Reproducción de Ruiz, 1993

Las diferencias poblacionales observadas no se reflejan genéticamente, por lo menos en el polimórfico gen *Xdh* y a este nivel son las poblaciones de *D. buzzatii* las que se muestran uniformes y las de *D. koepferae* las que presentan divergencias interpopulacionales, más acusadas en las poblaciones sureñas, indicando probablemente una distribución irregular de esta última (Piccinali, 2004). La falta de variación en ordenaciones cromosómicas recientes indicarían una expansión poblacional cercana en el tiempo de la primera (Gómez, 2003)

Interpretando las causas de la presencia de polimorfismos compartidos en los genes *Xdh* y *Est-A* hay autores que sugieren la posibilidad de la existencia de flujo génico en condiciones naturales (Gómez, 2003; Piccinali, 2004) Sin embargo, estas dos especies están aisladas en hasta tres niveles: ecológico, sexual y postzigótico (Fanara, 1999), existen test que no detectan hibridación interespecífica (Machado, 2002; Machado, 2006), y la ya citada morfología diferencial del *aedeagus* de poblaciones simpátricas revelan como sorprendente esta visión. En cambio en el laboratorio en condiciones forzadas ambas especies conservan cierta capacidad de cruzarse si se usan machos de *D. buzzatii* y hembras *D. koepferae*. Cuando se consigue descendencia siempre es en baja cantidad y viabilidad, y con problemas de esterilidad en machos como lo prueban los estudios en condiciones de laboratorio que consiguen híbridos de ambas especies. (Wasserman, 1983; Naveira, 1990; Naveira, 1991)

EL CICLO VITAL DE *DROSOPHILA*

La gran variedad de formas que se ven en la naturaleza hace que nos preguntemos cuál es el mecanismo para conseguirlo. La respuesta es la combinación de dos procesos: la evolución que produce cambios en el sentido de adaptarse al entorno, y el desarrollo que transforma una célula-huevo en un complejo organismo (Carroll, 2006). Ambos motores están en continua interacción y equilibrio, pero también en cambio, haciendo que en los organismos pluricelulares desarrollados una de las fases más críticas en la vida del individuo sea la etapa que comienza tras la fecundación y termina con la formación del adulto. Todo esta transformación está controlada primariamente por los genes, pero curiosamente al menos los animales compartimos un “kit” de herramientas genético básico para el desarrollo. Lo que nos hace distintos es cómo, cuándo y cuanto de un producto es sintetizado, y estas diferencias surgen en el proceso evolutivo (Carroll, 2006)

En este camino se producen una serie de procesos que no se repetirán en el ejemplar maduro como son la multiplicación celular masiva, las migraciones celulares y la especialización en diferentes tejidos y órganos, acompañados de la determinación de ejes de simetría anteroposterior, dorsoventral y lateral. El proceso se complica todavía más en el caso de los insectos con metamorfosis completa (holometábolos) como los Dípteros en los que la etapa intermedia larvaria da paso a una pupa, con tejidos embrionarios completos que experimentan apoptosis y reespecialización para convertirse en órganos definitivos. Toda esta transformación conlleva una autentica revolución genética mediante activaciones y desactivaciones en las que factores a menudo externos a la propia célula, como posición o momento en el desarrollo juegan un importante papel. Las células totipotentes del embrión se van transformando para adquirir un destino para convertirse en especialistas en las distintas funciones.

Las *Drosophila* son animales tan ampliamente utilizados en estos estudios que podemos esbozar una línea de conocimiento que nos aproxima a los fenómenos que ocurren durante el desarrollo, y aunque este trabajo no se encuadre específicamente en este tema, la aparición de anomalías morfológicas en los adultos híbridos nos induce a comentar las líneas generales de estos procesos centrándonos en la formación de las proporciones del animal, pues si bien variables ambientales como disponibilidad de nutrientes o superpoblación pueden afectar el tamaño, las proporciones relativas de cada parte se deben a rutas regulatorias de crecimiento de tejidos y órganos y a interacciones locales entre células en crecimiento que tienen como objetivo la coordinación de tres procesos fundamentales: la división, el crecimiento y la supervivencia celular. (Neto-Silva, 2009)

Determinación inicial de los ejes de simetría

La determinación de los ejes básicos de simetría del adulto se podría decir que comienza incluso antes de la fecundación, ya que están esbozados en el ovocito y viene provocado por un proceso en varias fases que comienza en la formación de unas cámaras de 16 células (cistocitos) conectadas por puentes citoplasmáticos. Sólo una completará meiosis y se diferenciará en ovocito y el resto constituirán las células nodriza (Gilbert, 2003). Estas últimas junto a las foliculares periféricas tienen un papel muy activo en la formación, transferencia e interacciones de productos por los que se determinará la polaridad del ovocito, y en último término, del adulto (Kugler, 2009; Lasko, 2012).

Existen varios productos génicos que influyen en este proceso, asociándose e influyendo en el ambiente intracelular y provocando en el ovocito una heterogeneidad en sus ARN_m y proteínas que determinará la simetría: una vez activado ya tiene fijado el eje anteroposterior y el dorsoventral y aunque existen varios ARN que intervienen, podemos resumir que el polo anterior se determina fundamentalmente por la presencia del ARN_m *bicoid* (Nüsslein-Volhard, 1987; Wang, 1991; Lasko, 2012); y en el otro la de *nanos*, fijada en el polo posterior. Para este último ARN es fundamental la actuación de *oskar* que impide la rápida desadenilización de *nanos*, estabilizándola, y favoreciendo su traducción (Zaessinger, 2006, Chang, 2011).

La traducción de los ARN_m *bicoid* y *nanos* crean una polaridad morfogénica que se mantendrá hasta el adulto y la difusión hacia el polo contrario crea un gradiente mixto y opuesto de ambas que tras la fecundación y comienzo de la multiplicación actuará sobre el sincitio de los núcleos resultantes. La cantidad relativa de cada proteína provoca la activación de distintos genes según posición y condiciona el órgano que dará en el futuro (Nüsslein-Volhard, 1987)..

Algo parecido ocurre con el eje dorsoventral: el ARN_m de *Gurken*, es transportado hacia la parte anterodorsal, donde se asociará a su receptor *torpedo* y reprimirá la síntesis de PIPE, que sí se produce en la zona ventral. Este “dorsalización” desencadenará la actuación diferencial de otros productos, fundamentalmente DORSAL, que terminarán determinando esta simetría señalando, por ejemplo, la formación del surco ventral y del mesodermo.

Estos factores se fabrican en las células nodriza y son transferidas al ovocito (Lasko, 2012), utilizando dos proteínas BICAUDAL-D y EGALITARIAN para asociarse a la dineína y atravesar los puentes citoplasmáticos entre nodrizas y ovocito (Kugler, 2009).

Paralelamente se desarrollará el tercer eje de simetría del individuo, el próximo-distal o lateral en el que se considera a las células de ambos lados copartícipes de un mismo ambiente físico y genético y con una evolución coordinada para dar estructuras perfectamente simétricas.

División superficial

Tras la fecundación ocurre una duplicación sincronizada sólo de los núcleos para producir un blastodermo sincitial. En las primeras 2 horas hay una división cada 10 minutos resultando una cantidad de 50.000 células en 12 horas, comenzando en la parte central y migrando luego a la superficie del embrión (Tadros, 2009). A partir de la división 14 comienza la invaginación de la membrana del sincitio para formar las distintas células y se va perdiendo la sincronización en las mitosis, pero no es hasta la trigésima división cuando los núcleos terminan de rodearse totalmente de membrana para formar auténticas células (blastodermo celular) (Gilbert, 2003).

Esta multiplicación nuclear y posteriormente celular tendrá una importancia capital al ser fundamental en el momento de activación de muchos genes la concentración de los productos como BICOID (Lasko, 2012), entre otros. También influye la relación entre tamaño de citoplasma y núcleo, que va decreciendo progresivamente al realizarse mitosis rápidas no compensadas por un crecimiento celular equivalente (Gilbert, 2003). El control de estas divisiones se realiza por el factor de estimulación de la mitosis (MPF), proteína heterodimérica que contiene varios tipos de proteínas de la familia de las ciclinas, reguladas por el citoplasma del huevo y que poseen un dominio específico altamente conservado (Faraldji, 2011) . Pese a que sólo las ciclinas A y B forman parte del complejo MPF, otras proteínas de esta familia, como la ciclina

G se ha demostrado fundamentales en los procesos de estabilización y control, especialmente en la reducción del ruido de desarrollo que se manifiesta en el adulto en fluctuaciones de la asimetría lateral, al intervenir en el mecanismo compensatorio entre crecimiento celular y ritmo de división (Debat, 2011)

Desde la activación del ovocito y a lo largo de esta primera etapa se realiza una transformación importante a nivel intracelular: los productos maternos son progresivamente sustituidos por la maquinaria genética del propio cigoto. Se eliminan fundamentalmente proteínas y ARNm que persistían en el embrión a partir del ovocito y que constituían hasta un 65% del total en *Drosophila melanogaster* (Tadros, 2009). Este proceso se denomina transición materno-cigoto (MZT) y ocurre en dos fases. En la primera, una parte de los productos maternos que controlaron la división y el destino temprano de las primeras células embrionarias son degradados. Parece que la proteína SMAUG se une a ellos, ligándose a continuación a una deadenilasa que elimina las colas poli-A haciendo inestable al ARN. Esta destrucción produciría la progresiva ralentización del ciclo celular, permitiría un equilibrio en la cantidad de ARN_m al sincronizar degradación materna-producción cigótica e iría pasando el control del desarrollo al propio cigoto. En la segunda fase a medida que SMAUG se acumula y su efecto se va haciendo mayor, desaparecen represores de la transcripción de origen materno y se sintetizan transcritos cigóticos micro ARN como *miR-309* que acelerarían la supresión de las moléculas restantes y provocaría un bucle de retroalimentación positiva. (Tadros, 2009)

El ritmo y la proporción al que ocurre la transición materno cigoto es propio de cada especie (Tadros, 2009). Cuatro hipótesis no mutuamente excluyentes se han postulado para su control: la primera se debería a la reducción de la proporción nucleocitoplasmática a medida que las células se van dividiendo (Tadros, 2009; Debat, 2011), la segunda se ajustaría a un “reloj materno”, en realidad una medida del ritmo de degradación de los ARN procedentes del ovocito; la tercera sería la limitada efectividad del mecanismo transcripcional durante la fase de rápida división debido al propio mecanismo mitótico y de replicación y la cuarta y última se debería a una necesidad de modificación de la estructura inicial de la cromatina para hacerla receptiva a los factores de transcripción (Tadros, 2009). Como se puede observar, en realidad todos son sucesos que ocurren interrelacionadamente en la MZT, y probablemente sólo son distintas facetas de un mismo fenómeno.

Gastrulación

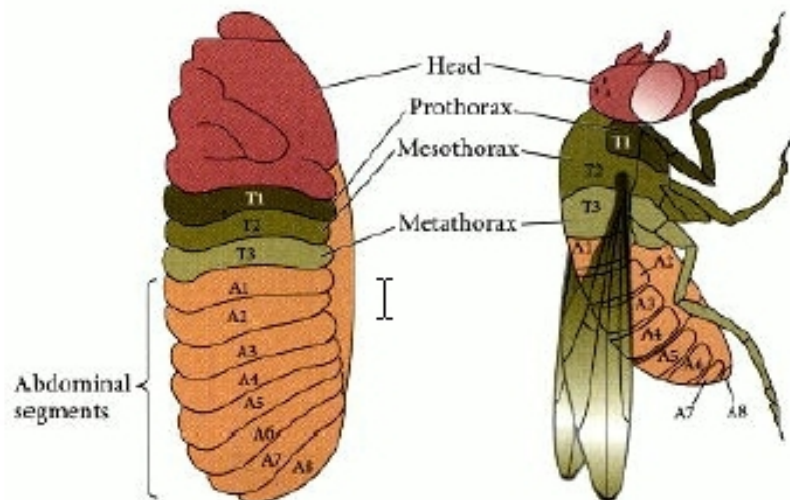
La formación del blastodermo celular desencadena inmediatamente la gastrulación, que discurre con procesos de cambios de forma migración, ingresión e invaginación de las células para formar las capas germinales (Tadros, 2009). Se crean surcos, ventral, intestinal y cefálico que tras invaginarse introducen en el interior del embrión las células que forman el mesodermo y el endodermo. El ventral es el primero en aparecer y se desencadena por la independización de las células. Inicialmente se distingue un dominio de 18 x 60 células de aspecto más aplanado que se va extendiendo hasta alcanzar el 70-80% de la longitud del embrión. Los núcleos celulares se sitúan basalmente y parecen empujar hacia el interior, mientras que surgen en la membrana modificaciones con forma de burbuja consistentes con la actividad del citoesqueleto. El movimiento se debe principalmente a cambios en dos parámetros: por un lado la adhesión entre las células varía por la acción de proteínas de polaridad BAZOOKA/ PAR-1, pasando de una posición subapical a otra más basal, facilitando su introducción, apoyada por la torsión de las células de alrededor, y generando una deformación de todo el tejido (Wang, 2013). El otro parámetro fisiológico es la reorganización de la

contractibilidad de las redes de actina-miosina provocada entre otras por la proteína G heterotrimérica, de la familia de las GTPasas, y la MYOSINA II, que desencadenan una constricción apical por cambios en la presión citoplasmática y forman las burbujas en la superficie (Kanesaki, 2013). La consecuencia de estas dos reorganizaciones es que lo que se veía en el embrión como una zona de apariencia distinta se convierte en un surco ancho pero poco profundo. Las células, que se habían alargado adquiriendo una forma tubular, se acortan hacia el interior.

En el caso del primordio del intestino medio el proceso es similar, con la diferencia de un menor número de células implicadas y una forma circular, no longitudinal. Tras el cierre de las invaginaciones, las bandas germinales comienzan a extenderse en el interior del embrión, la ventral formará el mesodermo y la otra el endodermo (Sweeton, 1991).

Gastrulación tardía-Segmentación

Tras la formación de los surcos comienza a observarse ya la segmentación: el embrión empieza a mostrar una serie de abultamientos y surcos, formando segmentos. En realidad, la unidad para la construcción del animal es el parasegmento, de los que se forman catorce, y que comprenden la región posterior de un segmento y la anterior del siguiente (Gilbert, 2003). Según su posición estos parasegmentos darán un tipo concreto de órgano adulto tras la activación de



Correspondencia en la segmentación entre embrión y adulto
Reproducción de Gilbert, 2003

cascadas de relaciones génicas complejas que marcarán el destino de la morfología y fisiología del animal. La determinación aquí ya es completa: se ha pasado de una especificación relativamente flexible por productos que muestran gradientes de concentración a una determinación absoluta.

Este cambio se consigue mediante la acción de los genes de segmentación, de los que existen tres categorías que se expresan secuencialmente. Los primeros en actuar serían los genes *gap* del que *hunchback* parece ser el principal. Son activados o reprimidos por los productos maternos y dividen al embrión en zonas que contendrán varios parasegmentos. A continuación, a partir del trigésimo ciclo de división (Gilbert, 2003), se expresan los genes de paridad segmentaria (*pair-rule*), principalmente *hairy*, *even-skipped* y *runt*, controlados por los productos de los *gap*, y que distribuyen al embrión en parasegmentos. Por último los genes de polaridad segmentaria determinan, dentro de cada segmento, la parte anterior y posterior. La manera de hacerlo es similar: las células situadas en la parte anterior presentan una alta cantidad de *even-skipped* (o *Fushi tarazu* o *paired*) y esto activa *engrailed*. A su vez esto estimula la producción de *Hedgehog*. La respuesta a la falta de *engrailed* es la formación de *Wingless*. La difusión de las proteínas correspondientes es

la responsable de que, dentro de cada segmento, las células adquieran su identidad. Una vez fijados estos parámetros, los genes homeóticos establecen las características específicas de cada segmento (Gilbert, 2003).

Una característica asociada a los insectos holometábolos es que no desarrollan totalmente su epidermis hasta el último estado larvario y la metamorfosis, aunque lo que serán los órganos epidérmicos adultos se encuentran desde el embrión en forma de los llamados discos imaginales. Son proliferaciones de células epiteliales del embrión que parten de unos primordios de 15 a 40 células y se multiplican hasta mil veces para formar los apéndices del adulto (Gerhold, 2011). Aunque proliferan en el interior de la larva en forma de sacos aplanados se mantienen conectados con el epitelio mediante un tallo. Existen un total de 21, estructurados por parejas excepto uno impar que corresponderá a la zona genital (Gilbert, 2003): seis para las patas, cuatro para alas y halterios, dos para ojos/antenas y así sucesivamente (Pareja, 2006).

Al comenzar la metamorfosis las células del disco imaginal se agrandan y comienzan la diferenciación y mientras lo hacen sufren una eversión y una expansión. Los discos del torax salen y posteriormente se fusionan, mientras que los de la cabeza evierten posteriormente, ya fusionados. Comienza con una intrusión de las células peripodiales en la epidermis larvaria, que se continua con una apertura (Pareja, 2006) que permite que el centro del disco se proyecte hacia fuera de modo que constituirá la parte más distal del órgano definitivo mientras que la parte interior formará las estructuras proximales. Aparte de las células propias, otras células que se sitúan pegadas al disco (adepiteliales) son arrastradas por este movimiento y formarán las estructuras necesarias para la funcionalidad del órgano, como músculos y nervios (Gilbert, 2003). La señal para esta eversión y posterior cierre de los discos es la expresión del gen *puc*, que desencadena una cascada de reacciones dependientes de la quinasa JNK (Pareja, 2006).

La investigación en los discos imaginales es un clásico en embriología. Se ha visto que cada zona ya está compartimentada en la primera fase larvaria (Gilbert, 2003) formando unidades relativamente independientes, con un destino fijado pese a que sólo tras la pupación alcanzarán la forma del órgano definitivo. La parte anterior y posterior de cada disco se determina por la acción del gen *engrailed*, que activa o no la señal *Hedgehog* (*Hh*) (Gorfinkiel, 2003). A su vez, la difusión de *Hh* es el condicionante principal de la actuación de morfógenos específicos, como *Decapentaplegic* (*Dpp*) y *Wingless* (*Wg*), que determinarán el destino del disco imaginal (Gilbert, 2003; Neto-Silva, 2009; Cruz, 2009; Gerhold, 2011). Estos morfógenos tienen en común fabricar productos de secreción que frecuentemente son factores de transcripción o proteínas relacionadas con la regulación de la expresión de otros genes *downstream*, que termina constituyendo los grandes dominios de expresión celular (Cruz, 2009). Existe un control sobre la corrección de estos procesos, que se suele relacionar con interacciones entre células. Un ejemplo sería en este mismo órgano la plasticidad que se aprecia entre dimensión y cantidad de células, de modo que un órgano normal puede formarse por células de división rápida y pequeño tamaño o por una situación inversa, indicando una importancia mayor del volumen de la masa celular que del número o tamaño individual (Neto-Silva, 2009; Gerhold, 2011).

Metamorfosis

La última gran revolución orgánica y genética se da en el proceso de metamorfosis. Los tejidos de la larva se transforman en tejidos adultos definitivos, lo que conlleva a menudo una desaparición por apoptosis de estructuras completas y reordenaciones de otras. Los órganos larvarios más destacables que se modifican de este modo son las glándulas salivares, el intestino medio y la pared muscular corporal, pero todo el

individuo cambia para formar el adulto, con un ritmo a veces asincrónico en los distintos órganos o tejidos, o incluso en secciones proximodistales de un mismo órgano, como ocurre en el ala o la pata (Ren, 2005)

El control genético de este proceso es complejo como demuestran estudios que encuentran modificación en la expresión génica de más de 1300 genes en un corto periodo de tiempo, sin contar las posibles modificaciones de actividad o localización proteica. Alteraciones en la expresión de uno o varios de estos genes conlleva la aparición de fenotipos aberrantes. En el caso del ala, probablemente el órgano más estudiado, aparecen defectos en pigmentación, en proteínas del citoesqueleto que determinan la forma o el desplegamiento (Ren, 2005).

Asociado a estos procesos la apoptosis es fundamental. Es un mecanismo ampliamente utilizado por los seres vivos pluricelulares para formar o eliminar estructuras, controlar el número de células o eliminar de células anormales, todos ellos sucesos comunes mientras el organismo se desarrolla. Su activación se produce por distintos mecanismos, como son la información del linaje celular, factores externos a la célula como las hormonas esteroideas o daño en el ADN. (Baehrecke, 2002). Están implicadas varias rutas de regulación génica, pero el desencadenante más frecuente es la activación de proteínas de la familia de las caspasas por la presencia de *Grim*, *Hid*(*Wrinkled*) o *Reaper*, Las *Drosophila* poseen siete tipos de caspasas distintos (Baehrecke, 2002) y algunas de ellas son capaces de formar a su alrededor un complejo multimérico llamado apoptosoma, que desencadena una cascada de reacciones que termina en la fragmentación del ADN y la muerte celular (Muro, 2006).

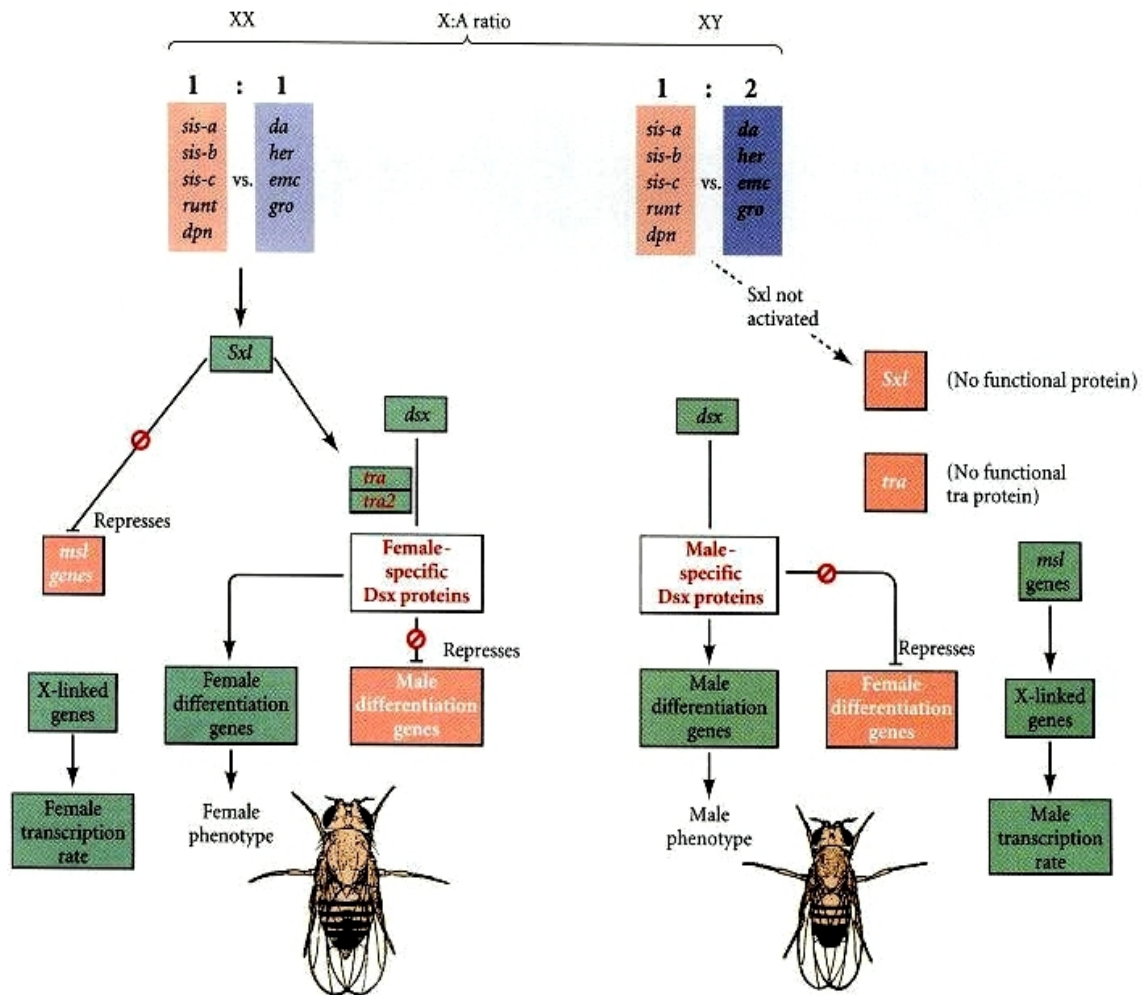
La importancia de estos procesos apoptóticos se observan en experimentos que, modificando estas interacciones obtienen una alta mortalidad en el periodo de pupa y adultos con una amplia colección de alteraciones del desarrollo como ojo reducido, alas vesiculadas, opacas o parcialmente extendidas, malformación de la línea central abdominal y genitalia rotada (Abbot, 1991; Macías, 2004; Muro, 2006; Link, 2007; Kuranaga, 2011)

Desarrollo de la línea germinal

Un ejemplo destacable que permite ver la integración de interacciones en el desarrollo sería la formación de los genitales y la línea germinal. Se implica procesos de determinación cromosómica del sexo, fenómenos de compensación de dosis, migración y especialización celular y apoptosis controlada, entre otros, pero en terminos de construcción del organismo se produce una asociación de todos los mecanismos comunes que van a dar como resultado genitales de macho o hembra mediante controles que, en gran manera, aunque con ciertas particularidades, se conservan en la mayoría de los insectos (Verhulst, 2010)

El principal factor para la determinación del sexo en *Drosophila* es la activación o no del gen *Sex-lethal*, que depende en último término del balance entre autosomas y cromosomas sexuales. Si la ratio es 1: 1 se activa y tendremos una hembra, si es 2:1 no se activa y tendremos un macho.

El mecanismo molecular deriva de la síntesis por parte del cromosoma X de factores de transcripción, habitualmente llamados numeradores, llamados *sisterless A*, *B* y *C* y *runt*, mientras que los autosomas fabrican inhibidores que compiten por los sitios de activación (Walker, 2000). Para conseguir suficiente cantidad de estos activadores es necesario que existan dos cromosomas X funcionales, mientras que en los machos XY la proporción no es suficiente y *Sex-lethal* no se activa (Verhulst, 2010).

Determinación sexual en *Drosophila*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi?book=dbio&part=A4137&blobname=ch17f16.jpg>

La proteína SXL es en realidad un factor de *splicing* diferencial (Parkhurst, 1994) que desencadena una cascada de maduraciones alternativas en el ARN y de activación de genes femeninos e inactivación de los masculinos (Sánchez, 2001; Luchessi, 2005).

En primer término actúa sobre el ARN inmaduro del gen *transformer* que se produce durante toda la vida larvaria y que presenta dos sitios alternativos de procesamiento. Sin la proteína SXL se escoge el primero y el resultado será una proteína más corta y no funcional (machos). Con SXL se evita esto y se usa el sitio alternativo, formándose un ARN maduro y funcional (Gilbert, 2003).

A continuación el *transformer* "femenino" activo interacciona con *transformer-2* y regula el *splicing* del ARN *doublesex*, provocando la presencia en las hembras del intrón 4, ausente en el de los machos (Verhulst, 2010). Tanto el *doublesex* de machos como de hembras son factores de transcripción que se unen a los mismos sitios, pero sus diferencias estructurales hacen que su función sea opuesta, y mientras uno activa genes

específicos de hembra e inactiva los de macho, el *doublesex* acortado de los machos hace lo opuesto. (Gilbert, 2003).

La activación diferencial de los distintos genes también hará que se formen las gónadas funcionales de cada sexo, aunque básicamente los procesos que siguen son similares. Se forman primero los primordios de las células germinales, y paralelamente en la zona caudal las gónadas en sí (Parhust, 1994). Las células germinales migran hacia la gónada, la ocupan y comienzan la meiosis para desarrollar, controladas por hormonas específicas, espermatozoides u óvulos. En *Drosophila*, tras la novena división un grupo de núcleos migran hacia la parte posterior del embrión, se rodean de un plasma germinal y son de las primeras células que se independizan (Gilbert, 2003). Los morfógenos de polaridad ya citados, como *Oskar* o *Nanos*, son básicos para señalar la posición en la que se desarrolla este proceso. Las 30-40 células germinales formadas se desplazan hacia el interior, primero pasivamente por movimientos asociados a la gastrulación, y luego activamente, dividiéndose en dos grupos y asociándose a las gónadas, que derivan de los parasegmentos 10-11-12. Finalmente, ambas se funden y comienza la formación de gametos (Gilbert, 2003). En la ovogénesis se produce la ya citada cámara de 16 células de la que sólo una será el ovocito, quedando el resto como células nodriza, aunque manteniendo puentes citoplasmáticos por los que se intercambian productos fundamentales para la formación inicial del adulto tras la fecundación. (Gilbert, 2003). El número de puentes es fundamental, pues sólo una de las dos células que mantienen cuatro con sus vecinas será el ovocito (Navarro, 2001). La determinación de cual será no es clara, pero la polarización del huso acromático en las cuatro divisiones que se producen para formar las 16 células parece ser el factor principal. Esta polaridad es establecida por la proteína PAR-1 (Navarro, 2001)

El disco genital formará la parte terminal del abdomen a partir de la fusión de los discos A8, A9 (que dará los genitales) y A10 (que dará la cloaca), pero presenta características particulares respecto al resto. En primer lugar presenta dimorfismo sexual, con desarrollo diferencial en machos y hembras, que se traduce en que de los tres primordios que contiene, el femenino deriva del segmento A8, el masculino del A9 y el anal del A10-11 (Gorfinkiel, 2003)

Otra de sus diferencias es que aunque actúan los mismos morfógenos que en el resto del individuo, son controlados en último término por los genes de determinación sexual (Gorfinkiel, 2003). La actuación de *doublesex* dictará cual es el que se desarrollará en cada individuo, reprimiendo *Decapentaplegic* mediante *Hedgehog* en los machos, y bloqueando la ruta de *Wingless* en las hembras (Sánchez, 2001), aunque la comunicación entre los distintos tipos de células también tiene importancia en el desarrollo coordinado de la *genitalia* (Gorfinkiel, 2003)

En el segmento A9 de los machos emergen dos troncos ventrales, que se funden y rotan 360° para dar la genitalia externa masculina, de modo que el espermiducto gira dextrogiamente sobre el intestino posterior. El segmento A8 forma dos anillos, uno de los cuales, el interior, rota con la genitalia, mientras que el exterior funciona como una pasarela que favorece el giro (Kuranaga, 2011) Esta rotación se produce fundamentalmente durante la pupación y en ella se ven implicados mecanismos de apoptosis que coordinan el movimiento del anillo exterior (Kuranaga, 2011). Existen mutantes y hemizigotos para los genes apoptóticos ya citados como *hid*(*Wrinkled*), *reaper* y *grim*, que no completan esta rotación, lo que relacionaría la eficiencia en la apoptosis con la correcta formación del adulto (Abbot, 1991; Macías, 2004; Kuranaga, 2011). Precisamente la diferente pauta de activación de *hid* es uno de los factores que determinan la diferenciación de los distintos genitales de hembra o macho (Benítez, 2010).

LOS CROMOSOMAS POLITÉNICOS

La base diagnóstica que nos ha permitido hacer este trabajo es la existencia en *Drosophila* de cromosomas politénicos. Estas estructuras, descubiertas en 1881 por Balbiani (Zhimulev, 2004) son 1024 copias unidas de ADN que produce cromosomas gigantes muy fáciles de ver a pocos aumentos, sobre todo a baja temperatura, que hace más definidas las bandas (Zhimulev, 2004). Al conservar un patrón de bandeo específico también permiten la localización de zonas concretas dentro del cromosoma y la identificación de especies (Zhimulev, 2009).

Son relativamente frecuentes en distintos grupos de seres vivos, en tejidos, órganos y fases del desarrollo donde se necesita una alta actividad, como por ejemplo en tejidos secretores durante etapas concretas del crecimiento sin pérdida de función (Zhimulev, 2009). Un prototipo serían las glándulas salivares de *Drosophila*, que responden a una intensa actividad durante la fase de mayor crecimiento y alimentación de la larva.

Las células que los forman no hacen mitosis después de duplicar su ADN, que no segrega y queda contenido en la membrana nuclear, que no desaparece al igual que el nucleolo. Como resultado la masa del órgano aumenta por crecimiento de pocas células, a un ritmo mucho más acelerado que si lo hiciera por mitosis y crecimiento celular normal (Zhimulev, 2009)

La politenización es uniforme a lo largo de la eucromatina, y sólo difiere en algunas regiones de heterocromatina intercalar y pericéntrica (Zhimulev, 2004). Una particularidad la presentan el cromosoma X de los machos, que al no tener homólogo, ocupa el mismo espacio con la mitad de copias, lo que hace que se aprecie más difuminado. Esto se consigue por las proteínas relacionadas con la compensación de dosis y la acetilación de histonas (Zhimulev, 2009). El bandeo se produce por distinto empaquetamiento del ADN sobre sus proteínas asociadas, resultando en una mayor cantidad de cromatina en las bandas (cromómeros) que en las interbandas, con un patrón altamente específico. (Zhimulev, 2004)

Las copias se mantienen juntas mediante sinapsis que suele ser completa en la mayoría de los organismos y que incluyen ambos homólogos en las especies diploides, de modo que observaremos un número haploide de cromosomas politénicos (Zhimulev, 2009). En algunas especies la sinapsis está ausente o es incompleta, lo mismo que al cruzar determinadas subespecies o especies cercanas (Zhimulev, 2009) como *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*.

Estas asinapsis cromosómicas somáticas consisten en regiones que pueden llegar a abarcar cromosomas completos en los que los ambos homólogos aparecen separados, en contra de lo que ocurre habitualmente. Aunque su proceso de formación no se conoce, se han observado una serie de factores que favorecen su aparición, como son temperatura, mayor condensación, cambios de estructura como inversiones o translocaciones, pero fundamentalmente la homología entre el ADN y el grado de parentesco entre especies (Riede, 1983)

La utilización de las asinapsis somáticas como sistema de determinación del un fragmento ajeno introgresado en híbridos ha salido en alguna ocasión a debate. Hay especies donde su aparición es poco específico como las del grupo *melanogaster*, sin embargo en *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae* ha quedado diafanamente claro a partir de muchos estudios la idoneidad de esta técnica como apropiada para

determinar fragmentos cromosómicos específicos (Labrador, 1980; Naveira, 1986a, 1986b, 1998, 1991; Carvajal, 1996, 1999; Fontdevila, 2014)

Se han hecho cálculos del contenido génico medio de cada banda del cromosoma porliténico entre 5 y 195kb (Zhimulev, 2004). En *Drosophila melanogaster*, con 3500 bandas, este valor en la eucromatina sería de aproximadamente 3 a 5 genes por cada banda de tamaño normal, que comprendería 30 kb, aunque la distribución puede ser heterogénea, con bandas poligénicas (como los de ARN_r en el organizador nucleolar), oligogénicas (22-3 copias) o con un solo gen (Zhimulev, 2004) Las interbandas, que oscilan entre 0.3 y 3.8 kb (Zhimulev, 2009), contendrían regiones menos condensadas que funcionarían como secuencias regulatorias de comienzo de la transcripción o genes permanentemente activos (Zhimulev, 2004)

DETERMINACIÓN DEL SEXO Y COMPENSACIÓN DE DOSIS

La reproducción sexual en una u otra variedad tiende a estar presente en la mayoría de los organismos vivos como un medio de intercambio genético entre linajes y para conseguir un significativo aumento de la variabilidad de las descendencias. Implica la separación de dos sexos que se sustancia desde una simple polaridad distinta hasta morfologías y fisiologías tremendamente separadas pero mutuamente compatibles y que progresan evolutivamente en paralelo.

Independientemente de las circunstancias específicas de cada taxón, a nivel general el establecimiento de sexos diferentes pero compatibles dentro de una misma especie plantea la evolución de mecanismos que, a partir de un mismo genoma, permitan formar dos identidades genéticas y de desarrollo diferenciadas pero compenetradas.

Pese a que el conocimiento preciso de los distintos mecanismos que controlan la caracterización del sexo está lejos de estar resuelta debido a nuestro desconocimiento de su desarrollo en muchos taxones (Uller, 2012) y al sesgo que se produce al generalizar a partir de estudios con organismos tipo (Mank, 2011) como las *Drosophila*, podemos decir que la formación de uno u otro sexo, de uno u otro órgano sexual o de la maduración de genitales masculinos y femeninos está controlada por la actuación de genes específicos que se activan o se reprimen de modo diferencial. El detonante que activa esta bifurcación orgánica es variado, pero existen dos posibilidades más frecuentes: la determinación ambiental y la determinación cromosómica. El primer caso es exógeno y depende de variables sólo parcialmente controlables por los progenitores, mientras que el segundo es endógeno, no controlable, y dependiente del balance entre autosomas y los cromosomas sexuales. Parece que en animales los mecanismos ambientales son los más arcaicos y han evolucionado en muchos casos hacia mecanismos genéticos, más estables y menos dependientes de un ambiente heterogéneo (Charlesworth, 2005; Uller, 2012). En plantas en cambio, la transición va desde un estado ancestral hermafrodita hacia individuos monoico y dioico. (Charlesworth, 2005)

Los cromosomas sexuales tienen características ligeramente distintas a los autosomas. La primera y más importante es la ausencia de homólogo en uno de los sexos, siendo este hecho el que realmente determina el sexo. Si embargo en los distintos grupos no siempre la misma dotación da el mismo resultado y un XY es macho en mamíferos o *Drosophila*, mientras que en las aves es la hembra la heterogamética ZW, y en los peces, por ejemplo, ambos cromosomas sexuales son idénticos (Ezaz, 2010)

En realidad no hay norma y así en clases como los reptiles podemos encontrarnos desde la determinación ambiental del sexo, determinación genética con cromosomas idénticos o claramente diferenciados, pero con machos XY y hembras ZW, o incluso varios cromosomas sexuales. Concretamente en lagartijas hay todo tipo de posibilidades incluso en poblaciones de una misma especie, sin una clara segregación filogénica y con mecanismos de asignación sexual lábiles. Concretamente en este grupo se ha propuesto una relación entre la sensibilidad a la temperatura, el tipo de sexo heterogamético y el grado de degeneración del cromosoma, viéndose que el origen de los cromosomas sexuales de distintos grupos ha tenido una evolución independiente. (Ezaz, 2010)

Esta última es otra de las características diferenciales de uno de los cromosomas sexuales: su degeneración, que se consigue tras un proceso evolutivo provocado por la pérdida de recombinación y un incremento asociado de zonas de heterocromatina (Charlesworth, 2005)

El origen de esta evolución parte de una zona cromosómica que contenga un loci de determinación sexual. La selección actuará para conservarlo reduciendo la recombinación y una vez que esto ocurre se ampliará esa carencia a regiones adyacentes cada vez más grandes (Charlesworth, 2005; Ezaz, 2010), probablemente por conflicto con alelos beneficiosos para un sexo y deletéreo para el otro que se agruparán sobre el mismo grupo de ligamiento, cada vez mayor.

Pruebas de estos procesos se han encontrado en la papaya, donde se ha visto una zona de aproximadamente un 10-13% de cromosoma que contiene genes específicos de macho. Un análisis más detallado indica que abarca el centrómero, es muy rica en heterocromatina altamente metilada, y divergente en su secuencia de su correspondiente en el cromosoma X. La consecuencia es la falta de recombinación y la degeneración de secuencia, presentándose como el origen de un cromosoma Y (Liu, 2004; Zhang, 2008). Otras zonas con parte de un autosoma no recombinante se han visto en peces y se consideran cromosomas sexuales “jóvenes” (Charlesworth, 2005).

Esta sucesión de acontecimientos es la causa última de la estructura del Y/W. La falta de recombinación impide la fijación de mutaciones beneficiosas y la eliminación de deletéreas en genes no relacionados con el sexo, además de favorecer la inserción de elementos móviles y el incremento de ADN satélite, que tienen como consecuencia la degeneración del cromosoma. Se ha visto en organismos haploides que la falta de recombinación es suficiente para esos procesos (Charlesworth, 2005), aparte de pérdida de genes activos por múltiples mecanismos entre los que destaca el trinquete de Müller, el *hitchhiking* genético y la interferencia Hill-Robertson (Rice, 1996; Charlesworth, 2005; Liu, 2004). No es este el paso final de la evolución de este tipo de cromosoma pues la acumulación de incompatibilidades puede hacer degenerar totalmente el cromosoma hasta su pérdida, constituyéndose dotaciones XO.

Podría pensarse que estos procesos afectan únicamente al cromosoma Y, pues el X permanece controlado en el sexo homogamético por recombinación y selección. Aparece en cambio el serio problema de que el cromosoma X contiene cientos de genes esenciales para la actividad normal de la célula y que no tienen porque estar relacionados con ningún aspecto sexual, y que se provoca un balance distinto autosomas/cromosomas sexuales en los sexos XX y XY/XO. En la práctica aunque el sexo homogamético tiene el doble de cromosomas X que el heterogamético, ambos contienen el mismo número de productos génicos codificados por el X (Gilbert, 1987). La solución evolutiva a esta situación se produce mediante mecanismos que afectan a la expresión diferencial de los genes situados en el cromosoma X y de los que Muller fue el primero en hablar denominándolos fenómenos de compensación de dosis (Muller, 1932 en Green 2010)

Este fenómeno cursa habitualmente siguiendo dos estrategias distintas: en mamíferos se realiza mediante la inactivación de uno de los cromosomas de las hembras, mientras que en *Drosophila*, por ejemplo, se realiza mediante el incremento de transcripción del X de los machos por la acción de factores de transcripción que se unen al cromosoma (Lucchesi, 2005) y que determinan la *ratio* autosomas:X (Parkhurst, 1994)

Este proceso cursa mediante un complejo regulatorio multimérico (MSL) que contiene ARN y al menos los productos de los genes *msl1*, *msl2*, *msl3*, *mle* y *mof*. La capacidad de reconocimiento parece depender de secuencias específicas del X no presentes en los autosomas. Una vez unido, el avance del “marcaje” sigue en *cis* (Zhimulev, 2004). La funcionalidad o no de este complejo proviene en último término de la presencia de la proteína SEXLETHAL, que inhibe el mecanismo en las hembras (Lucchesi, 2005) y lo permite en machos por falta de represión del gen *msl-2*, uno de los componentes del complejo (Zhimulev,

2004; Barbash, 2010). Su actuación está mediada a la unión a cientos de sitios a lo largo del cromosoma X correspondientes a los bordes de banda-interbanda del cromosoma politénico (Zhimulev, 2004), y coincide con la acetilación de la histona H4, que reduce el estrés de torsión del ADN, produce una estructura cromatínica más abierta y facilita la entrada de las polimerasas (Zhimulev, 2004; Lucchesi, 2005), lo que se traduce en una tasa de transcripción doble de los genes situados en el cromosoma X del macho (Barbash, 2010).

No es sólo un proceso asociado a la determinación del sexo, sino más bien al contrario, es la determinación del sexo la que influye sobre múltiples rasgos no específicamente relacionados con la línea germinal o la formación de gónadas. *Ratios* X:A intermedios producen mosaicos de hembras y machos, mientras que la falta de expresión en hembras o la expresión en machos de SXL desencadena letalidad sexo-específica (Parkhurst, 1994)

Una de las consecuencias evolutivas de este proceso es que el cromosoma X se enriquezca de genes que se expresan preferentemente en hembras y pierda los correspondientes de machos, aunque en este proceso también influyan otros factores (Assis, 2012)

FORMACIÓN DE NUEVAS ESPECIES

La formación de dos o más especies a partir de una preexistente es un fenómeno cuya consecuencia más visible es el enriquecimiento en biodiversidad. La compartimentación que produce es inherente a la propia vida en este planeta y permite un mejor acomodo a distintos hábitats, siendo precisamente esta progresiva adaptación diferencial lo que en último término provoca discrepancias que imposibilitan la reproducción entre poblaciones que en su momento pertenecieron a un mismo grupo genético y que podían entremezclar sus características.

Las primeras aportaciones históricas de tipo científico al mecanismo de formación de nuevas especies se remontan a principios del siglo XX. Willian Bateson en 1909 en uno de sus trabajos ya exponía claramente la necesidad de presencia y el número mínimo de incompatibilidades entre “razas”, adelantándose treinta años a lo que hoy se considera la base teórica del proceso.

“...Ahora bien, si la esterilidad en el cruzamiento de una raza es realmente la consecuencia de la reunión de dos factores complementarios, vemos que el fenómeno sólo podría ser producido entre la descendencia divergente de una especie por la adquisición de al menos dos nuevos factores; porque si la adquisición de un solo factor causa la esterilidad de la línea sería entonces su fin. Además cada factor debe ser adquirido por separado por individuos distintos, ya que si ambos se presentan juntos, los poseedores tendrían por hipótesis ser estériles. Y para imitar el caso de las especies cada uno de estos factores deben ser adquiridos por razas distintas. Los factores no necesitan, y probablemente no lo hagan, producir otros efectos perceptibles . . . En el caso de que el cruzamiento se hiciera entre los dos individuos complementarios y cualquiera de los factores entrase en juego, los efectos podrían ser incluso entonces no observado hasta que se reprodujera el mestizo...” (Bateson, 1909, en Orr, 1996)

Esta aportación quedo prácticamente olvidada hasta la actualidad, y no fue hasta los años treinta cuando los trabajos de Theodosius Dobzhanski, complementados con los de Hermann Müller, replantearon el problema en los mismos términos, fijando las discrepancias entre especies incipientes. Hoy se conocen como incompatibilidades Dobzhanski-Muller, o, para ser más justos, Bateson- Dobzhanski-Muller (DM o BDM). No fué sólo ésta la aportación de Dobzhanski, pues en su famoso artículo de 1936 determina que la esterilidad entre híbridos de *Drosophila* tiene un origen génico, algo que hoy en día es obvio pero que en el ambiente de la época era cuando menos rompedor. Contemporaneamente a estos pioneros, John B. S. Haldane postulaba en 1938 las diferencias morfológicas entre especies como resultado de la acción de genes (Orr, 1996), tras haber publicado en 1922 su famosa regla que más adelante se analizará. También en 1920 Alfred Sturtevant demostró la asimetría en la letalidad de híbridos entre *Drosophila melanogaster* y *Drosophila simulans*, dependiente de la especie donadora del cromosoma X. (Barbash, 2010)

El desarrollo de cada vez más potentes técnicas, sobre todo moleculares, a partir de la segunda mitad del siglo ha hecho que los datos obtenidos se multipliquen exponencialmente, frecuentemente arrastrados por el descubrimiento de nuevos métodos experimentales. Los estudios de polimorfismos isoenzimáticos, las técnicas de clonación e hibridación *in situ*, la ubícua PCR o los actuales chips de ADN que estudian el transcriptoma son hitos que potencian en conjunto la Genética y que también han difundido a la sociedad.

En el tema que nos ocupa han permitido la existencia de datos de variada procedencia técnica que se han integrado con los estudios clásicos.

Independientemente de la técnica utilizada, cuando queremos estudiar cómo se desarrolla la divergencia entre especies varios son los problemas que surgen:

- a) Es un proceso de límites indefinidos: realmente no se ha determinado a partir de que grado de divergencia morfológica, fisiológica o genética comienza la especiación y aunque el final del proceso lo marca la interrupción del flujo génico, muchos grupos considerados especies pueden intercambiar genes en ambientes naturales, incluso de manera más o menos estable formando zonas híbridas. Esto provoca polémicas sobre si realmente se está estudiando la especiación en acercamientos como la determinación de flujo génico entre subpoblaciones o, en el otro extremo, el estudio de diferencias entre especies cercanas.
- b) Tiene una dimensión multifactorial espacio-temporal variable (Noor, 2006). Dos especies pueden surgir de manera casi inmediata o pueden tardar millones de generaciones en separarse (Abott, 2013). Sobre todo en este último caso la multiplicidad de actores que pueden aparecer provocan consecuencias imprevisibles. Es posible la aparición de variaciones demográficas, nuevas oportunidades ecológicas, reordenaciones cromosómicas, épocas de flujo génico alternadas con aislamiento o entre otras muchas, nuevas alternativas en rasgos que al extenderse pueden hacer aumentar la divergencia o al contrario, unificar las subpoblaciones en una dimensión llamada a veces *continuum* de especiación (Seehausen, 2014)
- c) Es universal. Aún teniendo en cuenta las particularidades de organismos con reproducción asexual, el cambio evolutivo ocurre en cualquier grupo de seres vivos y esto inevitablemente puede diferenciarlos hasta formar nuevas especies. Podemos encontrar una inmensidad de ejemplos y de acercamientos desde distintos puntos de vista que a menudo arrojan luz sobre un aspecto, pero plantean preguntas sobre otros por lo que es lógica la especulación sobre la importancia relativa de los distintos fenómenos que están actuando.
- d) Es completo: al estudiarlo no puedes determinar las fases por las que ha pasado, y no se ha recreado un proceso de separación de especies significativo (Noor, 2006)

Como resumen de esta problemática podríamos decir que aunque las fuerzas que intervienen son en general conocidas, cada nueva especie ha sufrido su propia historia de divergencia, diferente a otra en el ámbito espacio-temporal, lo que dificulta extraordinariamente la elaboración de una teoría unificada.

MODELOS DE ESPECIACIÓN

Independientemente de los mecanismos que llevan a él hay un consenso general en que la formación de nuevas especies es un proceso de interrupción de flujo génico. Se desarrolla mayormente de una manera lenta y continuada que permite al principio la hibridación, luego produce esterilidad y por último la inviabilidad con barreras a la fecundación (Araripe, 2010). La discusión está en el cómo, el cuándo y la intensidad de la obstrucción durante el que ocurre este fenómeno (Weissing, 2011, Butlin, 2012).

Esta interrupción o disminución va provocando un aislamiento reproductivo que en la mayoría de los taxones se va desarrollando gradualmente (Orr, 2004). Este proceso de aislamiento se categoriza en precigótico y postzigótico: el primero comprende todos los procesos que previenen la fertilización (Koevoets, 2009) y suele traducirse en un fuerte apareamiento clasificado que impide o dificulta seriamente la formación de híbridos, por diferencias temporales (por ejemplo, maduración o celo), habitat, comportamiento, morfología o incompatibilidad de gametos (Butlin, 2012). Para muchos autores su existencia ya determina la separación de especies, mientras que para otros es necesaria la existencia de una diferenciación ecológica (Weissing, 2011). El aislamiento postzigótico existe si se produce apareamiento y la descendencia presenta problemas de fertilidad o inviabilidad (Koevoets, 2009). Se puede encontrar dividida en extrínseca, si la reducción de *fitness* es dependiente de la interacción ambiente-genoma e intrínseca si no lo es (Seehausen, 2014).

En el plano genético de la cuestión el estudio del aislamiento precigótico se basa en determinar los genes sometidos a selección sexual, como los responsables de los patrones de color, de comunicación química o comportamiento de cortejo. En el aislamiento postzigótico se intenta dilucidar fundamentalmente el origen de la esterilidad e inviabilidad de los híbridos (Koevoets, 2009). Para conseguirlo se suelen tomar dos enfoques principales de partida: la visión “génica” de la especiación, en la que un los genomas irían cambiando y aislandose progresivamente manteniendo un cierto intercambio y alternativamente el enfoque “integral”, que considera el genoma de cada especie como una red integral coordinada, en la que una relativamente pequeña intrusión de material haría desestabilizar el conjunto (Wu, 2004).

Sea cual sea la visión, el modelo más simple y para muchos también más común es el de la especiación alopátrida. Dos subpoblaciones quedan aisladas reproductivamente por una circunstancia externa y ajena a ellas como por ejemplo una barrera geográfica y van desarrollando diferencias por adaptación local propia de los ambientes en donde se encuentren, por coevolución o simplemente cambios genéticos neutrales (Presgraves, 2010(b); Abott, 2013), a un ritmo variable dependiendo de múltiples condicionante. Aunque la visión clásica da más importancia a la adaptación, no se pueden olvidar en el desarrollo de estas diferencias cambios que no tienen un matiz adaptativo, sino que son producidos por la propia dinámica intrínseca del genoma, como las mutaciones neutrales o levemente deletéreas, infección de patógenos o fenómenos asociados a ADN egoísta. (Presgraves, 2010(b))

El principal factor de acumulación de estos cambios es el tiempo. Si pasado un período se producen contactos secundarios, que pueden darse de modo puntual o continuo, formando las llamadas zonas híbridas (Abott, 2013), se ocasionará o bien una extensión de nuevas variedades de una población en otra o bien el aislamiento definitivo como dos especies si ya se ha sobrepasado un punto de no retorno. Ambas

posibilidades dependen del terreno incierto de la hibridación donde la reproducción es todavía posible pero las consecuencias de la entrada de nuevos alelos de una población en otra plantean disyuntivas.

Estrictamente hablando consideramos como hibridación la reproducción entre individuos genéticamente distintos (Abott, 2013), por lo que implica un cruzamiento factible y un flujo génico que no se ha detenido. En un primer acercamiento podemos señalar que el primer factor a considerar sería la cercanía entre las subespecies o incipientes especies parentales. Si hay poca distancia se suele reuniformizar las poblaciones por recombinación y flujo genético con asimetría en la mezcla, siendo la población local la que introduce la mayoría de sus alelos neutrales en la invasora, aún en situaciones de competencia, salvo que aparezcan selección, *hitchhiking* genético, apareamiento clasificado o desequilibrio sexual en el flujo genético con inviabilidad o esterilidad (Currat, 2008). Contradictoriamente, en estos últimos casos la introgresión de gran cantidad de alelos que no tienen porque estar ligados pueden crear variedad de fenotipos no testados ecológicamente que pueden ser adaptativamente seleccionados en ambientes intermedios, favoreciendo la formación de nuevas especie entre las dos parentales. Esto podría ser especialmente relevante en la invasión de nuevos entornos no explotados por los padres mediante híbridos (Abott, 2013), como parece ocurrir de manera incipiente entre las subespecies del insecto palo *Bacillus rossius* (Desmontis, 2010).

Al crecer la distancia se considera más común que en la mezcla poblacional las incompatibilidades entre genomas se pongan de manifiesto en forma de alopoloidía o de una reducción de *fitness* por esterilidad, inviabilidad o mala adaptación ecológica (Wu, 2004; Presgraves, 2010(b)). En este último caso el aislamiento postzigótico incipiente puede provocar reforzamiento del aislamiento precigótico (Weissing, 2011), en ocasiones realmente rápido, como ocurriría en el cambio de composición de los hidrocarburos cuticulares de reconocimiento sexual de las *Drosophila* (Higgie, 2000; Jennings, 2013) Estas situaciones pueden acentuar el proceso de especiación con resultado final de establecimiento de dos nuevas especies.

Pero, ¿siempre es así? No tiene porqué. Existen dos situaciones, la de simpatría y la de parapatría que plantean otros escenarios. En esencia ambas son similares en el sentido de que se refieren a especiación que se produce con coexistencia geográfica de las subpoblaciones y sin interrupción del flujo génico. En la primera incluso se habla de un intercambio elevado, mientras que en la segunda es fuertemente reducido por diversos factores. El intento de determinar la importancia relativa de estos modelos ha centrado la atención las zonas híbridas, de relevancia en los últimos años por la asunción de ser ahí dónde las dificultades encontradas en la formación de híbridos son el reflejo de la especiación incipiente (Noor, 2006). Los defensores de estos modelos argumentan que dado que la tasa de mutación es baja, pero las tasas de hibridación son altas (10-30% de seres pluricelulares, de los cuales 1% a 1 por 10000 son híbridos en simpatría), (Abott, 2013) esta podría ser la principal fuente de variabilidad en poblaciones naturales y su asociación con la adaptación sería un potente motor de divergencia. Además, el estudio de las regiones genómicas que generan barreras probablemente por una diferenciación mayor puede dar pistas sobre la arquitectura genética de los procesos de aislamiento (Noor, 2006)

La pregunta principal que estos modelos con coexistencia deben contestar es si se pueden producir barreras iniciales al flujo génico sin aislamiento reproductivo. La respuesta la pretende dar dos modelos insuficientes por si mismos, pero compatibles: el primero es el modelo ecológico, en el que una selección disruptiva desencadenaría una adaptación diferencial y el segundo el de selección sexual, en el que la preferencia de apareamiento por algún fenotipo haría divergir las subpoblaciones. Estos modelos han sido criticados por sus condiciones particulares de inicio y por la inestabilidad de sus primeras fases (Weissing, 2011) pero una combinación de ambos podría ser la solución a este posible mecanismo de especiación. Una

posible situación sería el caso de que las hembras prefieran a los machos que muestren externamente una mejor adaptación especializada a dos o más nichos diferentes, con híbridos de fenotipos intermedios menos adaptados. Habría que añadir como requerimiento una selección dependiente de la frecuencia, como por ejemplo una amplia distribución de recursos con curvas de utilización estrechas y una suficiente tasa de evolución de caracteres asociados a la selección sexual. (Weissing, 2011).

De todas maneras, se produzca la especiación en alopatría, simpatría o parapatría, hay un fondo genético común que subyace a cualquier mecanismo o modelo. Es necesario una acumulación de diferencias que estén ampliamente extendidas por los cromosomas y que impliquen a múltiples rasgos, y que impidan o dificulten la formación de híbridos, formando loci-barrera, definidos como aquellos producen reducción en la *fitness* del híbrido o cambios en la dinámica de elección de pareja (Abott, 2013). Los entornos en los que estas diferencias acumuladas rompen o refuerzan las barreras establecidas dependen de un balance entre la selección y la recombinación. Una relación S/R alta mantendrá e incluso incrementará las diferencias, una baja las difuminará (Abott, 2013)

DESARROLLO DE INCOMPATIBILIDADES

A nivel orgánico la aparición de divergencias que llevan al aislamiento reproductivo al no poder extenderse por la interrupción del flujo génico entre subpoblaciones se puede desarrollar a grandes rasgos por tres tipos de fenómenos (Wu, 2004), que no siempre son adaptativos (Presgraves, 2010(b))

- a) Cromosómicos: fundamentalmente poliploidía o cambios en la organización cromosómica (Presgraves, 2010(b)). Las incompatibilidades resultantes debidas a mitosis o meiosis aberrantes en híbridos derivan en una rápida especiación, siendo este fenómeno especialmente abundante en plantas (15% en angiospermas, 30% en helechos) (Abott, 2013).
- b) Extracromosómicos como son la presencia de simbiontes intracitoplasmáticos (Presgraves, 2010(b)), la movilización de trasposones en híbridos que producen reestructuración epistática en la vecindad de los puntos de inserción (Abott, 2013) o genes duplicados silenciados o activados diferencialmente en distintos cromosomas de especies distintas como el caso de *JYalpha* entre *D. simulans* y *D. melanogaster* las, también las incompatibilidades entre mitocondrias de una especie y genoma de otra, como ocurre en *Saccharomyces cerevisiae* y *S. bayanus*, *Nasonia* o *Trigloporus* (Presgraves, 2010(b); Beukeboom, 2015)
- c) Génicos producidos por incompatibilidades entre genes de las distintas especies que se van acumulando con el paso del tiempo. Este es el proceso que se considera más común (Presgraves, 2010(b))

Sobre todo en este último caso se van rompiendo complejos génicos coadaptados. El resultado es la progresiva aparición de las citadas incompatibilidades Bateson-Dobzhansky-Müller (BDM), por ser estos autores los primeros que postularon este modelo. Podemos definirlos como interacciones epistáticas entre alelos de diferentes loci fijados independientemente en poblaciones divergentes y que reducen la *fitness* de los híbridos (Butlin, 2012). Hay que tener en cuenta que dentro de cada población estos cambios pueden ser adaptativos, pero también simplemente neutrales y ponerse de manifiesto sólo en caso de hibridación (Presgraves, 2010(b)) y que generalmente es necesaria la acumulación de muchas de estas incompatibilidades para que el aislamiento llegue a ocurrir (Welch, 2004)

En cualquier caso este modelo está ampliamente aceptado y se puede encontrar en múltiples referencias (Presgraves, 2007; 2010(b); Matute, 2010, 2014; Cuykendall, 2014). Postula primero que un cambio alélico en un solo loci que provocara incompatibilidades dentro de una población será selectivamente eliminado o terminaría con la población (ver cita de Bateson, 1909, en página 42) por lo que se parte siempre de al menos dos loci (AABB), que al separarse y diverger originan nuevos alelos coadaptados y testados por la selección en una población (AABB/aabb) o en las dos (AAbb/aaBB).

Un contacto secundario originaría híbridos (AaBb) que presentan una combinación de alelos que no han evolucionado conjuntamente y pueden no funcionar coordinadamente, formando una incompatibilidad BDM. Un corolario que a menudo se explicita es que, aunque es común su expresión en forma de esterilidad o inviabilidad, los híbridos pueden expresar rasgos fenotípicamente diferenciales, que aunque intrínsecamente neutrales, son sometidos al juicio de la selección (Presgraves, 2010(a)). De hecho, muchos de los genes que provocan problemas en los híbridos han evolucionado bajo selección natural o deriva meiótica,

lo que sugeriría que cuando más rápido evolucione una especie mayor es la cantidad de incompatibilidades que se originan respecto a sus especies cercanas (Crespi, 2012; Matute, 2014; Zhang, 2015) y daría importancia a la propia selección natural divergente como una de las principales fuerzas de especiación.

En todo este proceso no hay que olvidar que las incompatibilidades no tienen que ser siempre de tipo nuclear, sino que también se presentan por el llamado “conflicto intragenómico”, definido como todo aquel antagonismo entre las secuencias de ADN o sus productos y el material que es heredado directamente. Un ejemplo serían las incompatibilidades nucleo-mitocondriales en *Triglopus* (Presgraves, 2010)

Un nuevo punto de vista se ha abierto en los últimos años señalando como al menos un factor a tener en cuenta no sólo al propio organismo, sino también a los posibles simbioses, no sólo intracelulares, sino también extracelulares como la biota intestinal. Se han visto indicios de convolución de organismos y sus simbioses digestivos específicos (Kikuchi, 2009). Tres son las razones que se alegan para este enfoque: i) los simbioses microbianos son universales en los eucariotas y de hecho en un organismo son más numerosos que las propias células; ii) La propia especificidad de la relación, que llega a ser indicador de filogenia en ambientes de dieta controlada; iii) El sistema inmunológico coevoluciona rápidamente para no atacar las bacterias simbioses o comensales, pero sí a las otras, incluyendo las no específicas (Bruckner, 2012)

Efectos mayores *versus* menores

Otro aspecto básico del proceso que aparece recurrentemente en los estudios del tema es hasta qué punto un cambio produce un efecto suficiente para lograr el aislamiento de dos especies o es la acumulación de factores, con interacciones multiloci el que lo produce (Cuykendall, 2014). En el primer caso se habla de efecto mayor, e incluso se les ha denominado “genes de especiación” (Orr, 2004). Hasta hoy en día la búsqueda de estos genes no ha reflejado que el aislamiento entre poblaciones se deba principalmente a este tipo de incompatibilidades. A continuación se exponen los encontrados hasta ahora en cualquier especie, pero sobre todo en el par más estudiado *D.melanosgaster* y *D.simulans*:

1) Inviabilidad

a) *D.melanosgaster*/*D.simulans*

- i) *Hmr*, en el X de la primera especie (Orr, 2004).
- ii) *Lhr* situado en el cromosoma 2 de la segunda (Presgraves, 2007). Este gen y el anterior se han descubierto primariamente en su forma que rescata la viabilidad. Ambos producen proteínas de unión al ADN en zonas de heterocromatina de centrómeros, telómeros y el cromosoma dot, zonas de gran cantidad de secuencias repetitivas y trasposones. La rotura de coevolución de estas zonas y los factores citados podría ser una de las causas de la inviabilidad en estas especies (Presgraves, 2007). De todos modos necesita la colaboración de otros factores para lograr su efecto (Cuykendall, 2014).
- iii) *Zhr* sobre el cromosoma X, que causa la inviabilidad por problemas en el empaquetamiento de la cromatina que derivan en mitosis incorrectas (Ferree, 2009).

iv) *Nup-96* y *Nup160* : en el cromosoma 3 de *D. simulans*, provocan invabilidad al alterar el complejo del poro de la membrana nuclear y su asociación con los ARN_m (Orr, 2004).

b) *Xiphophorus*

i) *Hmrk2* : se sitúa en el cromosoma X y produce una sobreexpresión de un receptor de la tirosinquinasa (Orr, 2004), un factor de crecimiento que activa la división celular

c) *Arabidopsis thaliana*

i) *HPA1* y *HPA2* en produce letalidad intraespecífica (Presgraves, 2010(b))

ii) *DM1*: causa letalidad por necrosis con una respuesta similar a la autoinmunidad (Blombies, 2007)

2) Esterilidad

a) *D.melanogaster* / *D. mauritiana*

i) *Odyseus*: situado en el cromosoma X. Codifica un factor de transcripción homeótico que altera la línea germinal, aunque para producir esterilidad completa necesita asociarse a otros factores (Orr, 2004; Morán, 2014)

b) *Sacharomyces bayanus* / *S. cerevisiae*

i) *AEP2*: en. Produce esterilidad por incompatibilidad mitocondrial (Presgraves, 2010(b))

ii) *OLI1*: alterar un elemento de la ATPasa (Presgraves, 2010(b))

c) *Mus musculus*

i) *Prdm9*: produce proteínas de unión al ADN anómalas (Presgraves, 2010(b))

d) *D.pseudoobscura*

i) *Ovd*: al cruzar subespecie, se altera la unión de sus productos al ADN (Presgraves, 2010(b))

Como se puede observar, no se han descubierto más de uno o dos factores de efecto mayor por par de especies. Lo que si se puede observar es que estos genes comparten varias características comunes: tienen funciones normales dentro de organismo, evolucionan rápidamente y están sometidos a selección positiva (Orr, 2004).

Aunque es innegable su existencia, hay que considerar que según la técnica de estudio que se emplee, lo que parece un efecto mayor pueden ser en realidad la acumulación de múltiples efectos poligénicos (Maside, 1995). De hecho la mayoría de las investigaciones se inclinan por efectos más de fondo, y parece más correcta la denominación de “loci barrera” (Abott, 2013) o “genes de incompatibilidad” (Presgraves, 2010(b)) como aquellos que contribuyen a la reducción o detención del flujo génico. Estos *loci* producirían efectos menores poligénicos (Naveira, 1992; Maside, 1995), que se irían acumulando gradualmente entre dos poblaciones y producirían la reducción de *fitness* de los híbridos por interacciones epistáticas entre ellos. Esta visión se ajusta a las observaciones sobre diferencias entre expresión génicas observadas que señalan una estructura más cuantitativa que cualitativa (Michalak, 2003). El límite estaría en el modelo “infinitesimal” en el que gran cantidad de genes de efecto menor serían los responsables de, por ejemplo, la esterilidad (Sherman, 2014). La discusión sobre la cantidad de estos factores sigue abierta. De hecho, factores considerados de efecto “mayor” como *Hmr* y *Lhr*, necesitan la colaboración de otros

elementos que no se han podido aislar, apuntando a una presencia de multitud de factores de pequeño efecto por todo el genoma, incluyendo el cromosoma X (Cuykendall, 2014)

Sea cual sea su número, en general estas interacciones son mayormente recesivas (Sherman, 2014), con una estimación de ocho veces más abundante que las dominantes (Presgraves, 2003), aunque se han localizado sobre el cromosoma X alelos dominantes que producen inviabilidad en cruces de distintas especies del grupo *melanogaster*, pero no en cruzamiento intraespecíficos, y que afectan a los machos, pero no a las hembras debido a diferentes interacciones cromosómicas (Matute, 2014).

La hipótesis “snowball”

El grado de acumulación de incompatibilidades entre genomas y sus efectos sobre la separación de las poblaciones es uno de las muchas cuestiones que abarca la especiación. En este ámbito surge la hipótesis de la bola de nieve (*snowball*). De filosofía epistática, afirma que a medida que se van acumulando cambios el número de incompatibilidades entre poblaciones crece de manera exponencial (Moyle, 2010; Presgraves, 2010(a)), debido al aumento de la probabilidad de que un locus afecte epistáticamente a otros. Cada diferencia puede afectar a un mayor número de otros loci, formando una especie de bola de nieve creciendo exponencialmente, al menos cuadráticamente si se consieran un par de locus, cúbicamente si se consieran tres, y así sucesivamente (Matute, 2010)., y se acumulan en mayor número sobre todo después de surgir las barreras reproductivas (Araripe, 2010).

Pese a su lógica, encontrar pruebas de esta hipótesis ha sido complicado y aún está sujeta a una cierta polémica, por la dificultad de discriminar número de diferencias y magnitud de las incompatibilidades en los trabajos prácticos. En el plano teórico se han realizado modelizaciones matemáticas que la demuestran (Welch, 2004), y experimentalmente también se pueden encontrar varios trabajos. Entre ellos están los cruzamientos entre *Drosophila melanogaster* y *D. simulans*, que han divergido hace 0.8 millones de años (Pal-Bhadra, 2008), encontrándose 10 incompatibilidades que llevan a la letalidad, mientras que con *D. santomea*, separada hace 10-12 millones de años, el número de letales se eleva a 65. (Presgraves, 2010(a)). Con el trío *mel/mau/san* en estudios sobre factores dominantes de inviabilidad asociados al cromosoma X también se encuentran pruebas de confirmación (Matute, 2010, 2014), al igual que con varias especies de *Solanum*, en los que estudiando *QTL* y esterilidad de polen se descubre que más del 85% de la divergencia se ha formado en etapas tardías de la separación, apoyando de nuevo la hipótesis (Sherman, 2014). Otro confirmación del efecto “snowball” se encuentra en estudios sobre esas mismas especies respecto a la esterilidad de la semilla (Moyle, 2010).

Regla de Haldane

Existen una serie de pautas que se dan cuando se estudian las incompatibilidades de los híbridos. Una de ellas es la llamada regla de Haldane, que fue postulada por este autor en 1922. Él mismo hace la mejor exposición:

“Cuando en la descendencia F_1 de dos razas animales un sexo está ausente, es raro o estéril, ese sexo es el sexo heterogamético” (Haldane, 1922)

El propio autor aclara antes de la cita que se refiere a cruzamientos entre especies, y que considera sexo heterocigoto aquellos que lo son para factores sexuales o factores ligados al sexo, tienen un número o una pareja impar de cromosomas y que producen dos tipos de gametos, que habitualmente determinan el sexo de la descendencia (Haldane, 1922).

Se cumple con muy pocas excepciones en la generalidad de hibridaciones entre poblaciones o especies incipientes, incluso en haplodiplontes (Koevoets, 2009). En una reciente revisión se encuentran trabajos que demuestran la regla de Haldane en 213 casos para esterilidad y en 381 para inviabilidad, en mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces teleosteos, varios grupos de insectos, crustáceos, gasterópodos y nemátodos (Schilthuisen, 2011). En los casos en los que no se cumple es frecuente la existencia de incompatibilidades citonucleares (Schilthuisen, 2011) o efectos maternos (Carvajal, 1996).

Tres son las teorías que intentan explicar esta regla a nivel genético:

Dominancia

Si tenemos dos poblaciones que han desarrollado incompatibilidades BDM en su genoma, tanto en autosomas como en los cromosomas sexuales, los híbridos F_1 serán heterocigotos para todos los genes, por lo que sólo las incompatibilidades dominantes se expresarán. Sin embargo, en el sexo heterogamético también se expresarán las recesivas, por lo que siempre detectaremos una menor *fitness* en ese sexo, como postula la regla. (Schilthuisen, 2011; Matute, 2014), sin embargo, la presencia de dos cromosomas X en las hembras hace que se dupliquen las posibles incompatibilidades, lo que lleva a que el nivel de dominancia deba ser $d < 0.5$.

Macho rápido

Los genes expresados preferentemente en machos evolucionan más rápido debido a que están sometidos a una doble presión selectiva: la selección sexual y la competencia entre machos. Por eso es más probable que acumulen cambios a mayor velocidad que las hembras, con la consecuencia de una disrupción más frecuente en la línea germinal de híbridos, como de hecho demuestran los estudios que encuentran una mayor cantidad de factores de esterilidad para machos que para hembras (Schilthuisen, 2011)

Esta hipótesis presenta dos problemas principales: sólo explica convenientemente la esterilidad híbrida, pero no la inviabilidad y tampoco la regla de Haldane en las especies con hembras heterogaméticas como las aves (Koevoets, 2009; Schilthuisen, 2011)

X rápido

Postula que si una mutación nueva es beneficiosa se verá más expuesta a la selección cuando esté situada en el cromosoma X y enmascarada en los autosomas, lo que derivaría en una tasa de evolución más rápida en el X que en los autosomas sobre todo cuando la mutación es recesiva (Michalak, 2003)

La discriminación entre las tres explicaciones puede venir por la tasa de evolución génica. La teoría de la dominancia no implica diferencias en los genes de expresión dependiente del sexo, mientras que las otras dos predicen una mayor tasa en los genes asociados a los machos, pero en un caso la fuerza evolutiva es la selección sexual, y en otra la exposición que se presenta en el sexo heterogamético (Koevoets, 2011). De los estudios existentes desde 1996, 82 apoyan la teoría de la dominancia, 42 la del macho rápido (incluyendo "sexo heterogamético rápido") y sólo 7 la del X rápido. Estudios sobre alteraciones en la regulación génica parecen apoyar la del macho rápido pero estos datos no hacen que se descarte tampoco la del X rápido

(Michalak, 2003). Otros trabajos apoyan al X rápido, pero sólo como contribución a mecanismos más generales (Naveira, 2003). Con seguridad la solución debe ser un consenso de todas en la línea que expusieron Turelli y Orr, modelizando una expresión matemática que combina las tres hipótesis como posibles resultados de distintas combinaciones de grado de dominancia, la proporción de incompatibilidades BDM del X frente a los autosomas y la tasa de evolución relativa de machos y hembras (Turelli, 1995)

Existen explicaciones alternativas que van tomando fuerza, como las interacciones X-Y, las incompatibilidades X-autosomas, divergencias en la deriva meiótica (Zhang, 2015), efectos maternos, etc, pero, aunque sus aportaciones son descartables, todavía cuentan un soporte experimental limitado (Schilthuizen, 2011; Crespi, 2012)

Efecto mayor del cromosoma X

Otra de las pautas que se encuentran al revelar incompatibilidades en híbridos es la mayor contribución al aislamiento interespecífico del cromosoma X frente a los autosomas. Los organismos con reproducción sexual y determinación cromosómica del sexo tienen dos posibilidades de organización dentro de la generalidad del genoma. Una determinada zona del ADN, génica, estructural, regulatoria o de cualquier otro tipo puede encontrarse en una autosoma o en un cromosoma sexual, sin estar necesariamente asociada a una función relacionada con la sexualidad o la reproducción. Esta posición tiene una importancia capital en la velocidad a la que la selección natural actúa sobre cualquier cambio en ella. La presencia de un sexo heterógamético del tipo XO o XY hace que modificaciones recesivas queden expuestas y se expresen, mientras que en los autosomas modificaciones de esa misma magnitud son cubiertas por la dominancia del cromosoma homólogo. El resultado es una tasa de evolución acelerada del cromosoma X, estimada en 2,5 veces la de un autosoma (Naveira, 2003) que lo lleva también a acumular un mayor número de incompatibilidades BDM y a tener un papel desproporcionadamente más grande cuando se le compara con los autosomas (Matute, 2014), mayor cuanto mayor sea la recesividad de las interacciones y cuanto mayor sea la densidad de genes relacionados con la reproducción que se sitúen sobre ese cromosoma (Naveira, 2003), lo que parece demostrado en varios estudios (Naveira, 1986; Barbash, 2010). Otro dato sobre su funcionamiento particular es la observación de una falta de genes expresados preferentemente en machos frente a los de hembras, haciendo que este cromosoma este “feminizado” (Assis, 2012)

La declaración de este efecto se debe a tres tipos de criterios: la introgresión de un fragmento en hemizigosis en el X debe tener un efecto mayor que dos veces el tamaño en heterocigosis o que el mismo tamaño en homocigosis en autosomas, o bien un efecto doble que la misma cantidad introgresada (Naveira, 2003).

Crisis de la F₂

Una gran parte de los estudios sobre especiación se centran en la obtención de híbridos entre poblaciones de una misma especie, o entre dos especies cercanas. Una de las características generales de estos estudios es que, aunque la F₁ es factible con alteraciones más o menos graves dependiendo de los

parentales, las F_2 sufren un incremento de incompatibilidades que multiplican las alteraciones. Este efecto se denomina crisis de la F_2 . Hay que tener en cuenta que a partir de la F_2 , las interacciones se vuelven más complejas, encontrándose tres tipos de interacciones distintas: las homocigoto-homocigoto (h_2), las homocigoto-heterocigoto (h_1) y las heterocigoto-heterocigoto (h_0) (Naveira, 2003). Los híbridos son genéticamente heterogéneos, y muchos de ellos suelen ser inviables o estériles (Sawamura, 2000)

Se considera producido por tres causas:

- la rotura de complejos génicos coadaptados que aún funcionan parcialmente en la F_1 , al tener un 50% de material de cada especie o población parental.
- La recesividad de las incompatibilidades, que queda cubierta en la F_1 por el homólogo dominante (Presgraves, 2003)
- La bajada de la heterosis, que es máxima en la F_1 (Novicic, 2011)

EXPRESIÓN DE LAS INCOMPATIBILIDADES

A medida que las incompatibilidades BDM se acumulan las posibilidades de que un contacto secundario reunifique las poblaciones se van haciendo progresivamente menores, sobre todo si se asume la hipótesis *snowball*. Estas incompatibilidades no se manifiestan en la propia población, sino que sólo aparece en situaciones de contacto secundario con flujo génico, es decir cuando se produce la hibridación, siempre que no se haya un aislamiento precigótico. En ese caso salen a relucir las manifestaciones más patentes del otro tipo de aislamiento, el postcigótico, que son la esterilidad, la inviabilidad (Welch, 2004; Presgraves, 2010) y las alteraciones en el desarrollo (Matute, 2010) de los híbridos, como consecuencia de tres fenómenos que ocurren a nivel molecular (Michalak, 2013):

- La acumulación de cambios en aminoácidos que hacen proteínas que no interactúan correctamente y producen fenotipos no aptos
- Disrupción de procesos posttranscripcionales como *splicing*, estabilización o transporte de ARN
- Cambios en la regulación génica

Cada vez más se están señalando la modificación en la regulación génica como la principal causa de estas alteraciones, así como cambios en el movimiento de ARN, disrupciones de la coordinación entre genes nucleares y nucleares con citoplasmáticos (Koevoets, 2009)

Inviabilidad y esterilidad híbrida

Como queda dicho, la inviabilidad híbrida es, junto con la esterilidad, una de las dos manifestaciones principales del aislamiento postcigótico intrínseco (Orr, 2004; Ferree, 2009; Matute, 2014). Tanto una como la otra se considera producida por acumulación de factores que desencadenan interacciones epistáticas que funcionando bien en su especie de procedencia, fallan en un fondo genético ajeno como el que se da en los híbridos (Michalak, 2003; Presgraves, 2003, 2007; 2010; Orr, 2004; Sherman, 2014). Varias son las características comunes que se aprecian al enfrentar el genoma de dos especies en un híbrido:

- a. Tanto la inviabilidad como la esterilidad sexo específica tiene un efecto mayor en los machos (regla de Haldane) porque su arquitectura cromosómica potencia la acumulación secuencial de cambios que interactúan y han coevolucionado, mientras que en las hembras las interacciones son más sencillas (Sherman, 2014). Este efecto proviene del distinto sistema de regulación y ambiente cromosómico de machos y hembras (Matute, 2014), por lo que una mutación puede tener diferentes efectos (Melklejohn, 2014). Por eso en las interacciones que se originan tiene una importancia capital las incompatibilidades relacionadas con el cromosoma X (Naveira, 1986; Presgraves, 2003; Matute, 2014; Cuykendall, 2014). La consecuencia es que los genes de expresión diferencial entre sexos tienen mayores diferencias en las secuencias de ADN y en el patrón de expresión que otros tipos de genes (Orr, 2004)

- b. Los factores que las producen son mayormente recesivos (Naveira, 2003; Gavin-Smith, 2013; Matute, 2014; Cuykendall, 2014)
- c. Los efectos son asimétrico dependiendo de la dirección del cruce entre especies (Welch, 2004), lo que señala a factores genéticos heredados de manera uniparentales y que provocarían incompatibilidades nucleo-citoplasmáticas (Matute, 2014).
- d. Las incompatibilidades que se encuentran son específicas de cada linaje y varían según sea el par de especies que se hibride (Matute, 2014), y también de la población dentro de la especie que se emplee (Araripe, 2010; Gerard, 2012)
- e. Para formar una incompatibilidad es necesaria la interacción de varias introgresiones, situadas a menudo en distinto cromosomas (Bolkan, 2007) no sólo por sus interacciones epistáticas, sino por la existencia de una probable redundancia genética que canalizaría cambios individuales (Welch, 2004)
- f. Muchos de los cambios afectan a la regulación y expresión génica (Noor, 2006), lo que provoca patrones anómalos de expresión que genera la incompatibilidad, muchos de ellos sexo-específicos (Ranz, 2004; Melklejohn, 2014). Se ha estimado en estudios de expresión génica que cientos de genes pueden desregularse en híbridos (Michalak, 2003; Melklejohn, 2014) y que, dentro de los factores conocidos de incompatibilidad, las proteínas de unión al ADN son altamente frecuentes (Araripe, 2010)
- g. Cuanto más rápido evolucione una zona del ADN más probabilidad tiene de provocar una incompatibilidad (Ferree, 2009; Araripe, 2010)

Esterilidad

La esterilidad evoluciona antes y se produce más rápido que la inviabilidad (Maside, 1996; Naveira, 1998; Orr, 2004), y afecta a rasgos relacionados con la reproducción (Araripe, 2010), lo que es incluso observable a nivel morfológico al verse malformaciones primero en la línea germinal respecto a la somática (Ranz, 2004). Las alteraciones en los rasgos de implicación reproductiva son una de las causas de la incompatibilidad de interacciones entre los genomas de cada especie en los híbridos (Chatterjee, 2007), pues cuando se desestabiliza un factor que tiene que ver con la reproducción, se produce una selección hacia un nuevo mecanismo coordinado, empujando distintas poblaciones a fenotipos diferentes que al ponerse en contacto pueden producir un conflicto genético (Werren, 1998). Un ejemplo sería la formación de un rasgo que al profundizar en el dimorfismo sexual contribuya al éxito reproductivo (Assis, 2012) y será seleccionado

El hecho probado es que los genes que se expresan preferentemente en machos evolucionan más rápidamente (Assis, 2012). Este resultado se debe probablemente a la sensibilidad especial de la línea germinal o a la selección sexual que hacen que los genes de fertilidad masculina diverjan más rápidamente (Werren, 1998; Presgraves, 2003). Se explica por la evolución más rápida de los fragmentos de ADN asociados a genes relacionados con el sexo debida a la selección positiva que lleva a una evolución rápida de la esterilidad (Orr, 2004; Chatterjee, 2007), a su especial sensibilidad a variaciones en la expresión genética debida, por ejemplo, a la compensación de dosis y a diferencias en la proporción y el estado de heterocromatina y eucromatina entre machos y hembras (Melklejohn, 2014)

Los sistemas de regulación también se ven alterados y favorecen la incompatibilidad, especialmente en los genes expresados preferentemente en machos (Michalak, 2003; Ranz, 2004; Melklejohn, 2014), en los

que se observa una desregulación cuando se sitúan en híbridos entre dos especies (Michalak, 2003, Pal-Bhadra, 2006). Se podría explicar esta desregulación por alteraciones en el nivel del empaquetamiento de la cromatina, que además produciría mitosis anómalas (Ferree, 2009), lo que tendría una influencia especial en la línea germinal por la elevada tasa de división que se requiere para la gametogénesis. Uno de los apoyos de esta explicación viene por la condensación anormal, seguida de mitosis defectuosa observadas en hembras híbridas estériles de *mel/sim*, que vuelven a la normalidad si se delecciona el factor *Hmr* de *D. melanogaster* (Bolkan, 2007). También influiría en la fuerza de la unión de proteínas al promotor, que se ha demostrado variable en híbridos (Michalak, 2003)

Hasta ahora, los factores de esterilidad descubiertos tienen en común su tendencia a acumularse tanto en autosomas como en cromosomas sexuales, aunque en una mayor cantidad en estos últimos (Naveira, 1986, 1992, 1998; Maside, 1996; Marín, 1996; Michalak, 2003; Araripe, 2010), ser recesivos y formar parte de mecanismos que en las especies parentales se relacionan con el fenómeno de compensación de dosis (Matute, 2014). El número de factores de esterilidad, sobre todo masculina (Sawamura, 2000), que se encuentran en el genoma es a menudo discutido.

Aparte de los pocos factores que por si solos o en relaciones simples pueden producirla (ver esquema página 48), se han realizado estimaciones de cuantos puede haber: en el par *mel/sim*, el 5% del genoma introgresado parece contener hasta seis zonas que provocan esterilidad (Sawamura, 2000). En nuestras especies de trabajo, *D. buzzatii* y *D. koepferae*, Marín, utilizando los datos de investigaciones de otros autores llega a la conclusión de que la esterilidad se explica por la introgresión conjunta de un par de entre cinco o seis zonas autosómicas entre los cromosomas tres y cuatro. (Marín, 1996)

Sin embargo parece que la explicación más amplia es la acumulación de pequeños elementos que interactúan de manera epistática (Araripe, 2010), pero que resultan indetectables individualmente hasta llegar a un mínimo desencadenante que provoca la esterilidad (Naveira, 1998). Estos elementos tienden a acumularse en zonas de baja recombinación y son intercambiables, de modo que lo realmente determinante es su cantidad y no su localización (Morán, 2014). Esto es lo que a menudo se conoce como modelo de “umbral poligénico” (Naveira, 1986; 1992, Maside, 1996; 1998; Morán, 2014)

En el caso de nuestras especies de trabajo, las predicciones de Marín son cuestionables porque en la práctica y en los datos originales, cualquier combinación de las regiones predichas conlleva superar el umbral poligénico y si no lo hace, no se produce esterilidad (Naveira, 1998). Este umbral se situaría entre el 30% y el 40% del cromosoma autosoma, que se puede conseguir en una sola introgresión o en varias en distintos cromosomas, sin que importe su localización genética (Naveira, 1986, 1998). En el caso del cromosoma X, cualquier región introgresada produce esterilidad, indicando una mayor cantidad de factores que en los autosomas (Naveira, 1986)

Cumpliendo la regla de Haldane, el sexo heterogamético suele ser el más afectado (Presgraves, 2003) Ejemplos del proceso serían los genes o factores que influyen en la esterilidad de los machos híbridos de especies gemelas de *Drosophila simulans* y *Drosophila sechelia* o *Drosophila mauritiana*, que son más frecuentes que los que producen esterilidad en hembras, o inviabilidad, además, la localización de estos factores es más frecuente sobre el cromosoma X que sobre los autosomas (Naveira, 1986; Barbash, 2010). A medida que las dos especies incipientes se alejan filogenéticamente, los cambios producidos en ese momento desarrollarán una cantidad mayor de incompatibilidades BDM que los producidos en etapas iniciales de la separación, de modo que tiempo e esterilidad híbrida no se relacionan linealmente sino exponencialmente (Sherman, 2014), como predice la hipótesis de la bola de nieve (*snowball*). Las primeras alteraciones que se observarían serían

malformaciones en la línea germinal y retraso en el tiempo normal de desarrollo y llegada a la vesícula seminal (en el caso de los machos), como se ha demostrado en el par *sim/mau* (Maside, 1998)

Todos estos hechos hacen surgir un debate sobre si es estos procesos son los responsables último del aislamiento postcigótico, porque lo que si parece claro es que una vez que se empiezan a acumular loci que producen esterilidad, se considera que la separación ya es irreversible (Matute, 2014; Sherman, 2014)

Inviabilidad

La inviabilidad aparecería después debido a que los cambios producidos no estarían sometidos a una selección tan intensa dentro de la especie de procedencia. De todas maneras, su tasa de evolución es mayor que de las mutaciones neutrales (Matute, 2014). Afectaría sobre todo a genes de gestión interna, desarrollo o regulación general (Araripe, 2010)

La cantidad de factores que producen inviabilidad a lo largo del genoma es también tema de estudio. Son menos frecuentes que los de esterilidad en una proporción que se ha calculado entre siete y diez veces menor (Carvajal, 1996). En el par *D. simulans/melanogaster* se han ido encontrando progresivamente más factores, tanto en autosomas como en el cromosoma X, y hasta 71 (de los cuales 13 recesivos en el cromosoma X) entre *D. melanogaster* y *D. santomea*, pero una caracterización precisa es difuminada por las interacciones epistáticas que se establecen, que hacen que el mecanismo concreto que provoca la inviabilidad híbrida permanezca oculto (Matute, 2014). Muchos de esos factores se descubren al observar rescate en la inviabilidad por medio de determinadas combinaciones que a menudo implican delecciones o inserciones de fragmentos que provocan pérdidas parciales o totales de la función normal y aunque ya se han citado locus concretos, incluso relacionando más de una pareja de factores (Carvajal, 1996), también se ha observado el mismo efecto de rescate con una base multigénica y dependiente de la población dentro de la especie (Gerard, 2012). La explicación poligénica epistática se apoya también en las alteraciones morfológicas que llevan a inviabilidad en el par *mel/san* (Gavin-Smith, 2013).

La causa directa de la inviabilidad también se discute: un deficiente mecanismo de determinación del sexo y del fenómeno asociado de compensación de dosis puede estar correlacionado con la letalidad de los machos. Existen alteraciones en los componentes del sistema multimérico de compensación de dosis que producen letalidad, y se dejan de encontrar proteínas de este complejo en los machos inviables (Barbash, 2010). Además se ha visto evolución rápida producida por selección positiva divergente en cuatro de los genes del complejo: *msh-1*, *msh-2*, *msh-3* y *mof*, de *D. melanogaster* (Pal-Bhadra, 2006; Barbash, 2010). En híbridos *mel/sim* SXL, la proteína básica de la determinación sexual, presenta alteración en su expresión que causa cambios en la expresión génica *downstream* y produce letalidad. La regulación normal se recupera en los híbridos con el factor *Lhr*. (Pal-Bhadra, 2006; Chatterjee, 2007)

De existir, esta inviabilidad constituiría un subcaso de las incompatibilidades BDM, pues no serían producidas por interacciones físicas, sino por el fondo genético de los híbridos (Matute, 2014). Esta interpretación, sin embargo, es rechazada alegando la observación de iguales fenotipos aberrantes en machos y hembras, aunque de menor intensidad en estas últimas (Gavin-Smith, 2013), una transcripción en el X no especialmente alterada en híbridos (Cuykendall, 2014) y por que las mutaciones en genes que intervienen en la compensación de dosis no aumentan, sino que incluso disminuyen la letalidad híbrida y que realmente no es un fenómeno exclusivo de machos, sino más bien asociado al tipo de cromosoma X del híbrido. (Barbash, 2010). De todos modos estos mismos autores reconocen la posible participación de

incongruencias en el complejo de compensación de dosis en la letalidad tanto de hembras como de machos, pero no sexo-específica.

La observación de un cromosoma X más delgado y con anomalías de empaquetamiento en híbridos *sim/mel* se interpreta como problemas en la compensación de dosis (Chatterjee, 2007), pero también es una de las observaciones que apoya una interpretación que cada vez esta tomando más fuerza y que podría explicar muchos resultados: la probable modificación de la estructura íntima de la cromatina por alteración del estado de las histonas en los híbridos (Pal-Bhadra, 2006) o/y cambio en las secuencias repetitivas en la heterocromatina, que son zonas de rápida evolución y en las que se encuentran grandes variaciones entre especies cercanas (Ferree, 2009)

Estas divergencias alterarían tanto los mecanismos mitóticos (Bolkan, 2007, Ferree, 2009) como regulatorios, repercutiendo en el sistema de desarrollo y produciendo esterilidad al afectar a la línea germinal (Ranz, 2004) e inviabilidad y otras alteraciones morfológicas al perturbar la línea somática (Gavin-Smith, 2013). En esta línea se ha observado que *Lhr*, que recupera la inviabilidad entre *sim/mel*, produce recuperación del desarrollo de los discos imaginales subdesarrollados en híbridos, aunque también asimetría fluctuante (Chatterjee, 2007) (ver página siguiente) y parece haber divergido por evolución adaptativa y coevolucionado con secuencias heterocromáticas (Ferree, 2009)

Existe otra posible explicación complementaria por diferencias en el transcriptoma producidas por diferentes niveles de expresión de loci asociados a macho o a hembras, como demuestran trabajos que encuentran de cuatro a ocho veces más sobreexpresión de genes masculinos y subexpresión de los femeninos en hembras híbridas de *D. simulans/melanogaster* (Ranz, 2004). Estos niveles aberrantes de expresión pueden deberse también a incompatibilidades en las uniones de proteínas reguladoras por condensación anómala de los cromosomas (Chatterjee, 2007). Como se ve, la importancia de los cromosomas sexuales en la inviabilidad también es grande y estas posibles explicaciones podrían ser distintas expresiones de un mecanismo común.

El momento en el que se produce la inviabilidad también está sujeto a discusión. Es frecuente que se sitúe en el momento de la pupación (Carvajal, 1996; Presgraves, 2003) como resultado de un retraso en el desarrollo (Chatterjee, 2007), aunque los trabajos de los últimos años señalan más hacia la muerte en fase embrionaria (Matute, 2013), incluso en la fase precelular (Ferree, 2009) producida por alteraciones en la transición materno-cigótica relacionados con deficiencias en la condensación de la cromatina (Gerard, 2012) y/o defectos mitóticos (Ferree, 2009). Existen también trabajos en híbridos de *D. santomea/melanogaster* que asimilan la inviabilidad con las malformaciones en la segmentación abdominal e involución de la cabeza en ambos sexos, pero mucho más intensa en machos, que produce la muerte en fase embrionaria (Bolkan, 2007; Gavin-Smith, 2013).

Tal vez la explicación de los distintos estudios provenga de la distancia en la que se sitúan los pares de especies analizados, dejando aparte efectos locales. Por ejemplo en el par *mel/sim*, separado hace 0'8 millones de años (Pal-Bhadra, 2006), la mortalidad se produce mayoritariamente en fase de prepupa, mientras que en *san/mel*, separadas hace 10 millones de años, la mortalidad es anterior y se coloca ya en los embriones. De todos modos, sea cual sea la fase en la que se desencadena la muerte del individuo parece tener su origen primario en la embriogénesis (Gavin-Smith, 2013), aunque luego se desarrolle por distintos mecanismos (Chatterjee, 2007)

Alteraciones en el desarrollo

Las alteraciones del desarrollo pueden ser otro de los mecanismos fundamentales de reducción del flujo génico si afectan a la *fitness* del individuo o si reducen o eliminan la reproducción (Gavin-Smith, 2013). En el capítulo de desarrollo embrionario ya se han esbozado alteraciones producidas por alteraciones en genes concretos, pero existen numerosos estudios que se centran en efectos más sutiles que se expresan en desviaciones de simetría.

Desviaciones de simetría

En el desarrollo del embrión se forman polaridades que se traducen en los ejes dorso-ventral y anteroposterior. En cambio en el eje derecho-izquierdo la simetría es la norma en la inmensa mayoría de los organismos, con la particularidad de que la formación de ambos lados del cuerpo se debe a la actuación de los mismos genes.

A pesar de eso, tres son las situaciones en las que se desvía esta correspondencia lateral:

- Antisimetría(AS): producida por el desarrollo del órgano de un lado de manera desproporcionadamente mayor que el del otro, aunque promediando individuos se apreciaría una distribución bimodal de media cero. Un ejemplo típico serían las pinzas de los cangrejos violinistas (*Uca sp.*). (Palmer, 1992).
- Asimetría direccional (DA): un órgano es de mayor tamaño o se sitúa preferentemente en un lado del cuerpo, con distribución media distinta de cero, como ejemplificaría la forma de los lenguados (*Solea sp.*) o la posición de nuestro propio corazón. En ambos casos el origen de las diferencias estarían controladas por el propio organismo y no representarían una alteración del desarrollo normal (Palmer, 1992; Albarrán, 2010)
- Asimetría fluctuante (FA): refleja las pequeñas diferencias entre los lados derecho e izquierdo del cuerpo respecto a la total simetría. Si existe es tomada habitualmente como inestabilidad en el desarrollo producido por problemas tanto en el entorno genético como ambiental en el que el individuo se va formando (Palmer, 1992; Garnier, 2006; Carreira, 2008; Albarrán, 2010).

Se suele considerar que un incremento en este último tipo de asimetría indica dificultades para completar con éxito la formación del adulto, por lo que su análisis se ha utilizado frecuentemente como un parámetro de medida de la capacidad de superar estrés ambiental, de la *fitness* del individuo, la de las poblaciones a largo plazo (Beasley, 2013) o el de su potencial evolutivo, aunque también se ha discutido su utilización de manera automática (Lens, 2002; Tsujino, 2012) .

Ruido del desarrollo

La parte genética de la inestabilidad expresada por la asimetría fluctuante o ruido del desarrollo estaría causado por diferencias aleatorias en las tasas de procesos fisiológicos, fundamentalmente en la producción de ADN, ARN y proteínas, en la compartimentación intra e intercelular y en los movimientos

celulares (Holloway, 2011). Las diferencias entre células llevan a roturas de su comunicación y subsiguientes divergencias en crecimiento, división y diferenciación (Lens, 2002) que sobrepasan la capacidad de superar estrés genético o ambiental, tanto interior como exterior. En el caso de los híbridos entre especie las alteraciones en el desarrollo pueden ir de la letalidad hasta defectos leves (Gavin-Smith, 2013). Una de las expresiones de este desequilibrio es la asimetría que se ha encontrado en los híbridos de especies distintas, no sólo entre *Drosophila* (Sawamura, 2000; Presgraves, 2003; Rego, 2006), sino también en otros insectos como escarabajos (*Carabus solieri*) (Garnier, 2006), peces (*Enneacanthus gloriosus* x *E. obesus*) (Graham, 1984) o vegetales como robles (*Quercus magnoliifolia* x *Quercus resinosa*) (Albarrán, 2010). A veces incluso quedan de manifiesto en zonas híbridas entre subespecies como en los insectos palo *Bacillus rossius rossius* x *Bacillus rossius redtenbacheri* (Desmontis, 2010)

En el caso de Dípteros varios trabajos las analizan morfométricamente usando mayormente el ala como órgano tipo. Los resultados son levemente contradictorios pues aunque se encuentra un incremento de asimetría fluctuante en híbridos (Garnier, 2006) también existen análisis que discuten esta interpretación. En uno de ellos (Rego, 2006) detecta una fuerte asimetría en híbridos F₁ de *D. medeirensis* con *D. suboscuro*, pero concluye que un efecto tan fuerte no puede ser explicado por causas en principio sutiles. Señala que parte de las diferencias que habitualmente se consideran asimetría fluctuante quedan enmascaradas en realidad una asimetría direccional (DA), aunque también se deberían tener en cuenta estudios anteriores que sí descuentan la DA en la determinación de FA (Graham, 1984). Otro estudio utiliza híbridos F₁ de *D. buzzatii* con *D. koepferae*, y analizando parámetros morfológicos alares llega a la conclusión de que la FA no es diferente entre las especies donadoras y los híbridos (Carreira, 2008).

El consenso entre estos resultados se consigue considerando la existencia de dos factores antagónicos: por un lado el aumento de heterocigosidad de los híbridos empujaría hacia una mayor estabilidad y por otro la rotura de complejos génicos coadaptados hacia la asimetría (Graham, 1984; Albarrán, 2010). Existen investigaciones que desvelan que dentro de los mismos híbridos se encuentran diferencias significativas en uno de cuatro caracteres analizados. La explicación ofrecida mide la fuerza relativa de cada factor en términos de mayor tiempo de divergencia entre especies más control de selección más o menos firme dependiendo de la funcionalidad del órgano (Garnier, 2006), y que llevaría a un desplazamiento de los híbridos por disminución de su *fitness*. Se podría encontrar incluso una situación opuesta en zonas híbridas entre subespecies, en las que la presencia de un ecotono puede hacer que la selección natural logre readaptar los complejos génicos híbridos pero exclusivamente en ese ambiente intermedio, sirviendo esto incluso como marcador de eventos de mezcla antiguos (Graham, 1984). En estudios entre híbridos poblacionales de *Drosophila suboscuro* durante la F₁ y la F₂, se pueden seguir estos procesos: la FA de la F₁ intrapoblacional es menor que la interpoblacional, pero ambas son menores que la de las líneas parentales. Curiosamente en la F₂ existe una reducción de esta asimetría (Novovic, 2011). La explicación que da este mismo autor concluye que la heterosis de la F₁ mejora la estabilidad del desarrollo y, aunque pareciera contradictorio, la reducción observada en la F₂ se debería precisamente a la rotura de complejos génicos coadaptados por recombinación, que haría que sólo las combinaciones más positivas se desarrollaran y no se permitiría el resto. La divergencia mínima entre poblaciones de la misma especie ejemplifica las distintas interacciones que se producen entre estas fuerzas y que a veces ofrecen resultados en apariencia contradictorios.

Compensando la inestabilidad: la canalización del desarrollo

En cualquier caso parece claro que de existir la asimetría fluctuante entre híbridos tiene una base genética más que ambiental (Albarrán, 2010; Desmontis, 2010), pero estas manifestaciones no se observan de manera inmediata. Hay que tener también en cuenta la existencia de sistemas de control que constituyen mecanismos de la llamada esbilización del desarrollo (Novicic, 2011) y que evitan o al menos minimizan la aparición de anomalías, protegiendo de incidentes genéticos y/o ambientales.

Podemos citar como ejemplos la actuación del péptido *Dilp8*, en esencia un regulador del momento de entrada en metamorfosis. Mientras un disco imaginal larvario no ha alcanzado su nivel de crecimiento las células lo segregan señalando al tejido adyacente su nivel de desarrollo y la metamorfosis se retrasa por inhibición de la producción de ecdisona a nivel cerebral. Cuando el tejido alcanza su tamaño esperado y deja de producir el péptido la pupación comienza. Este sistema proporciona el tiempo suficiente para la sincronización de distintos tejidos y órganos, aunque no es efectivo si el disco imaginal está fuertemente dañado o empequeñecido. Mutantes de este péptido desarrollan tiempos de pupación alargados aumentando su variabilidad de tamaño y de proporciones relativas de los distintos órganos, incrementando sus fluctuaciones de asimetría lateral. Podemos concluir que su función principal es regular el tiempo del desarrollo, la estabilidad y la robustez del desarrollo (Garelli, 2012; Colombani, 2012). Tal vez se relacionaría con esta actuación los resultados de medidas del tiempo de desarrollo de 411 delecciones, cubriendo el 65% del genoma de *Drosophila melanogaster*, en los que encuentran 11 que lo retrasan asociándolo a inestabilidad, aunque independientemente de la asimetría encontrada en otras delecciones (Takahashi, 2011)

Otro de los factores de control importantes descubiertos sería la actuación de la chaperona *Hsp 90*. Su acción más evidente sería contrarrestar el impacto de variaciones de temperatura sobre el desarrollo de las células interaccionando y estabilizando la estructura de la cromatina (Gilbert, 2007; Gursky, 2012). Este proceso es especialmente interesante porque la *Hsp 90* inicial es de origen materno y se reparte homogéneamente por el blastodermo sincital. Tras la sexta división comienza a desaparecer progresiva y asimétricamente y a ser reemplazada por la propia del cigoto, regulada por la presencia de *Bicoid*. Parece ser que no sólo hay un efecto estructural de la cromatina, sino que *Hsp 90* es capaz de inhibir indirectamente la movilización de trasposones actuando sobre *Piwi*, proteína de unión al ARN. Otro sistema de estabilización importante serían los microARN capaces de unirse a ARN mensajeros y bloquear su traducción. Se ha observado que mutantes para estos microARN expresan anomalías fenotípicas, pero sólo en situaciones de estrés o de fluctuaciones en la cantidad de factores de regulación. Ambos producirían de manera independiente un equilibrio que se traduciría en robustez en el desarrollo (Gursky, 2012)

No hay que olvidar que además de los factores que se han esbozado y de muchos otros que se organizan en rutas derivadas, existe un control intrínseco de las propias células asociado al crecimiento de sus vecinas de modo que división, tamaño y especialización se sincronizan vinculadas al grupo local y es posible una respuesta rápida del conjunto ante estrés o daño. Relacionado con este proceso estaría la propia competencia intercelular que determinaría una apoptosis diferencial hacia células más débiles en situaciones donde el crecimiento diferencial deriva en disparidad metabólica (Neto-Silva, 2009). Los procesos de regeneración ante un daño y proliferación compensatoria para reemplazar células ausentes serían cauces para obtener un desarrollo homogéneo mediante la sensibilización de las supervivientes a factores de crecimiento que producirían desarrollo más rápido en esas células (Gerhold, 2011). El hecho de que una célula o tejido entre en apoptosis o no depende del equilibrio entre señales pro y antiapoptóticas, y esto constituye una manera de controlar el crecimiento correcto (Benítez, 2010)

En cualquier caso ya se han señalado mecanismos que contribuyen a la llamada canalización del desarrollo, proceso por el cual las pequeñas diferencias serían minimizadas o eliminadas para conseguir un fenotipo similar, escondiendo a veces genotipos o condiciones de organogénesis levemente diferentes. A medida que las células totipotentes se van especializando el número de posibilidades se van reduciendo hasta conseguir un determinado tipo celular. Por debajo de un umbral de variabilidad una célula tendrá siempre su destino determinado. Si se supera ese umbral las consecuencias serán aleatorias (Gursky, 2012). Este control sería ejercido más que por la actuación de genes concretos por la coordinación de todo el sistema en desarrollo, como queda de manifiesto en los ejemplos expuestos anteriormente. Una mutación o un cambio lo suficientemente intenso como para desequilibrar el sistema produciría una vulnerabilidad ante factores en principio débiles pero de consecuencias intensas. Una diferenciación orgánica correcta exigiría por consiguiente un equilibrio entre mecanismos de estabilidad y canalización del desarrollo y disruptores ambientales o genéticos (Lens, 2002; Debat, 2011).

OBJETIVOS

- I. Comprobar el aislamiento precigótico de *Drosophila koepferae* y *Drosophila buzzatii* mediante el análisis de sus comportamientos copulatorios
- II. Testar la posibilidad de sustitución de fragmentos cromosómicos de *Drosophila koepferae* en *Drosophila buzzatii*. que abarquen la totalidad del cromosoma 4
- III. Localizar posibles factores de inviabilidad o esterilidad recesivos repartidos por el cromosoma 4
- IV. Estimar tamaños mínimos de introgresión cromosómica que provoquen efectos en la *fitness*, en los apartados de fertilidad, viabilidad y desarrollo
- V. Analizar las diferencias en fertilidad, viabilidad y desarrollo de una misma región en homocigosis y en heterocigosis
- VI. Buscar posibles efectos combinatorios de las distintas arquitecturas cromosómicas construidas por la combinación de los distintos fragmentos dentro del cromosoma 4 que produzcan alteraciones de la fertilidad, viabilidad y desarrollo

MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIONES Y CEPAS UTILIZADAS

Se utilizaron isolíneas de las especies de *Drosophila buzzatii* y *Drosophila koepferae*, fundadas a partir de hembras capturadas en la naturaleza. Todas ellas fueron cedidas amablemente por el doctor Antonio Fontdevila a partir del cepario del Área de Genética, Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad de Barcelona. Se mantuvieron en cruces masales excepto *buzSL-inv4s letal*

Drosophila koepferae

Procedentes de las siguientes localidades:



San Luis (Argentina)

- Cepa K SL 8: capturada en la sierra de San Luis (Argentina) por A.Ruíz y A.Fontdevilla en Noviembre de 1979. En principio mantenida mediante dos cepas independientes que se fusionaron en una sola el 24-02-84. Constitución cromosómica 2 j¹l⁹m⁹; 3st; 4st; 5st

- Cepa KSL 58
- Cepa KSL 88

Vipos (Argentina)

Palo Labrado (Argentina)

Drosophila buzzatii

Procedentes de las siguientes localidades:

San Luis (Argentina): capturadas en la sierra de San Luis (Argentina) por A. Ruíz y A. Fontdevilla en 1979

- Cepa buzSL5
- Cepa buzSL-101, que tiene fijada una mutación "white" recesiva, obtenida a partir de una línea derivada de buzSL-10 por H. Naveira en 1986
- Cepa buzSL-6
- Cepa buzSL-inv4s, proviene de la cepa San Luis, en la cual se fijó la inversión del cromosoma 4.
- Cepa buzSL-inv4s letal: a medida que se realizaba este trabajo cruzamientos, apareció dentro de la inversión 4s/s un cambio que llevaba a letalidad en las moscas homocigotas para la inversión. Este letal fue seleccionado como marcador y mantenido en una forma semejante a un letal equilibrado (ver pg. 83)

Carboneras (Almería- España): (buz-11 del cepario de la Universidad Autónoma de Barcelona),

Dean Funes (Argentina): buz-5 del cepario de la Universidad Autónoma de Barcelona

Cañete (Perú) buz-ca

Atoqampa (I) (Perú): buz-aI

Atoqampa (II) (Perú): buz-aII

Huarochari (Perú): buz- h

Wari (I) (Perú): buz-waI

Wari(II) (Perú) :buz-waII



MEDIOS DE CRÍA

Medio sintético comercial

Se utilizó el medio sintético comercial de la marca *Carolina Biological Supplies* en su fórmula 4:24. Se escogió este medio por su facilidad de manejo, su amplia distribución comercial y la posibilidad de un control mayor en replicas experimentales

Es un medio deshidratado, por lo que se complementó con una solución líquida, al 50% en volumen, elaborado de la siguiente manera:

1) Solución de levadura concentrada:

Se deja hervir durante 20 minutos 120g de levadura fresca de panadería disuelta en 200ml de agua

Se añade agua estéril hasta completar los 300ml

Tras dejar enfriar, se le incorpora 2'5ml de ácido propiónico, 27ml de solución de Nipagin (al 10% en etanol) y 2'5g de cloruro sódico

Esta solución se reparte en porciones de 20ml y se congela a -20°C para su conservación a largo plazo

2) Solución líquida final

Se mezcla 20ml de solución de levadura congelada con 100ml de agua estéril. Esta solución es la que se incorpora a las escamas de medio comercial al 50% vol.

Este es el medio de cría utilizado por defecto: mientras no se diga lo contrario se debe entender que el experimento referido se realiza sobre este sustrato

Medio cocinado "tradicional"

Su empleo se restringió a los cruzamientos dirigidos a la obtención de híbridos F₁ entre las especies objeto de este estudio.

Elaboración:

1. Solución 1: Se deja hervir durante 20 minutos una mezcla de 150ml de agua, 2'25g de agar-agar, 22'5g de levadura fresca de panadería y 0'4g de cloruro sódico
2. Solución 2: En 100ml de agua se mezclan 31'5g de harina de maíz
3. Se mezclan las soluciones 1 y 2 al fuego removiendo hasta que adquiere una consistencia adecuada. Se retira de la fuente de calor
4. Cuando la temperatura baja de 60°C se le añade 2'25% vol de solución de Nipagin (al 10% en etanol) y 2/1000 vol de ácido propiónico.

Pese a que demostró unos resultados en la cría ligeramente superiores al comercial, se descartó su uso general por la dificultad de encontrar un aporte homogéneo de determinados ingredientes, por su menor comodidad, corta duración y por introducir un elemento de variabilidad de composición no deseado en la práctica experimental

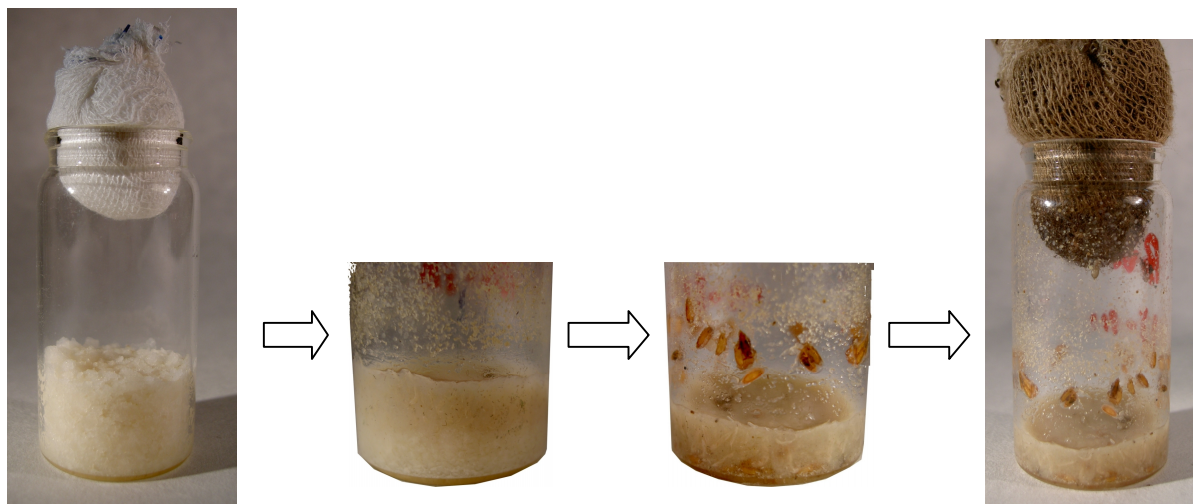
Medio cocinado "tradicional" enriquecido

Provocada por la casi nula proporción de cruces positivos para híbridos F_1 , se ensayaron distintos medios basados en el anterior, al que se le enriquecía con una solución de plátano. Al igual que el medio descrito anteriormente, su uso se restringió a la obtención de F_1 , por las mismas razones

Tras varias pruebas en las líneas madres de *D. koepferae* y de *D. buzzatii*, la mejor composición resultó ser:

1. Se deja hervir durante 20 minutos una mezcla de 150ml de agua, 1'12g de agar-agar, 22'5g de levadura fresca de panadería y 0'4g de cloruro sódico
2. En 100ml de agua se mezclan 16g de harina de maíz
3. Se mezcla 200ml de plátano triturado con las soluciones 1 y 2 removiendo al fuego hasta que adquiere una consistencia adecuada. Se retira de la fuente de calor
4. Cuando la temperatura baja de 60°C se le añade 2'25% vol de solución de Nipagin (al 10% en etanol) y 2/1000 vol de ácido propiónico.

En cualquiera de los tres casos se reparte el medio en tubos de cultivo con tapones de algodón con gasa estéril, donde las moscas realizan su desarrollo y se hacen los test de los distintos experimentos:



TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN

Este trabajo se basa en el reconocimiento, recuento y caracterización de distintos aspectos de las líneas conseguidas. En estas observaciones se utilizaron indistintamente las lupas Olympus modelos SZ-30 y SZ-40 y los microscopios Olympus BX-50 y CH-2, ambos con sistema de contraste de fases.

Las fotografías fueron tomadas en esos aparatos mediante adaptadores con una cámara Konica-Minolta G-600, habitualmente a 40 aumentos al usar la lupa y 400 en el caso de los microscopios, en este último caso preferentemente en contraste de fases por permitir una mayor definición y contraste.

Sexado

Adultos

Se durmieron las moscas con éter o CO₂ y con ayuda de un pincel y la lupa (Olympus SZ-30 y SZ-40) se reconocieron los genitales externos de uno u otro sexo

Larvas

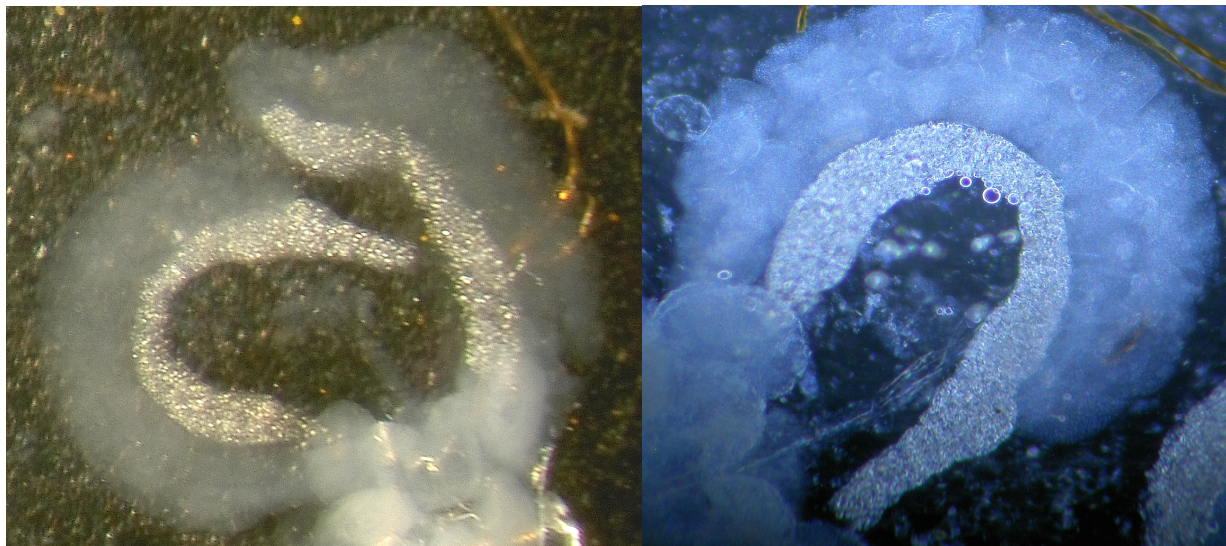
Se introducen en una gota de solución salina y se observa el tercio inferior de la larva a la lupa (Olympus SZ-30 y SZ-40). A través del tegumento se transparentan los esbozos de lo que serán testículos (ovoides y de gran tamaño) y ovarios (también ovoides pero su pequeñez hace que sean prácticamente invisibles).



Observación de cromosomas politénicos

Disección de larvas y extracción de glándulas salivares

Se seleccionaron del medio de cultivo larvas del tercer estadio y del mayor tamaño posible. Se introdujeron en una solución de ácido acético al 45% (ácido acético glacial puro más agua estéril) y se diseccionaron mediante agujas enmangadas, separando con cuidado las glándulas salivares, procurando limpiarlas de grasa y tejidos adyacentes. En estas manipulaciones se utilizaron indistintamente las lupas Olympus modelos SZ-30 y SZ-40



Microfotografías de glándulas salivares, izquierda a la lupa (x25) y derecha al microscopio (x30). En esta última se pueden identificar células individuales en la parte superior

Tinción y observación

Se pasaron las glándulas salivares a una gota de solución orceína acética-láctica (70% Orceína acética, 30% ácido láctico) colocada sobre un portaobjetos y se dejaron teñir unos 10-15 minutos en el caso de observación microscópica en campo claro. Si se utiliza contraste de fase, el tiempo no resulta trascendente pues la tinción sólo favorece el contraste.

Tras este tiempo se colocó un cubreobjetos y se golpeó levemente la zona de las glándulas, con objetivo de romper las células y los núcleos para liberar los cromosomas. A continuación se situó la preparación entre dos hojas de papel de filtro para absorber el exceso de colorante y se realizó un *squash* delicado para aplastar los cromosomas.

Las preparaciones cromosómicas teñidas fueron observadas al microscopio, tanto en campo claro como en contraste de fase (según se lograra una mayor claridad de observación) con los microscopios Olympus BX-50 y CH-2, ambos con sistema de contraste de fases.

Las fotografías fueron tomadas en esos aparatos mediante adaptadores en una cámara Konica-Minolta G-600, habitualmente a 400 aumentos preferentemente en contraste de fases por permitir una mayor definición y contraste.

Observación de genitales

Se tomaron adultos y se sometieron a un ambiente con éter. Una vez muertos se pasaron a una gota de solución salina (0'9%) y con ayuda de unas pinzas se tiró con delicadeza de los últimos segmentos abdominales, rompiendo el tegumento y arrastrando los órganos internos. Se limpiaron los testículos y se pasaron a un portaobjetos con una nueva gota de solución salina.

Una primera observación se desarrolló a la lupa Olympus modelos SZ-30 y SZ-40 a aumentos variables, estimando su normalidad o atrofia.

Tras este primer acercamiento se situó un cubreobjetos sobre la preparación y se pasó al microscopio Olympus BX-50 o CH-2, en contraste de fases sucesivamente a 200 y 400 aumentos



En el caso de que no se encuentre esperma móvil, se retira la preparación y se realiza un *squash* muy suave entre hojas de papel de filtro, y se vuelve a observar al microscopio.

Las fotografías fueron tomadas en esos aparatos mediante adaptadores en una cámara Konica-Minolta G-600, habitualmente a 40 aumentos

ESTUDIO DEL CORTEJO

Una de los estudios que se realizaron a lo largo de este trabajo fue la observación del cortejo de *Drosophila buzzatii* y de *Drosophilla koepferae* para intentar inferir un método que aumentara el porcentaje de éxito en los cruzamientos híbridos entre ambas. Para conseguirlo se cuantificaron tres parámetros: la proporción de parejas que copulaban, el comienzo y la duración de la cópula.

Se utilizaron las isolíneas argentinas de San Luis 8, 58 y 88 y de Palo Labrado en *Drosophila koepferae* y de San Luis (6) y Carboneras (España) en *Drosophila buzzatii*.

Se separaron los machos y hembras en las primeras veinticuatro horas desde su nacimiento para asegurar su virginidad y se mantuvieron separados durante tres días para garantizar su madurez sexual. Posteriormente se establecieron cruces por parejas hasta un número de cincuenta en cada población en condiciones de luz natural y temperatura ambiente del laboratorio

Se observó el comportamiento general de cada una de las parejas registrando el momento de la cópula y su duración tomada desde el acoplamiento a la separación. A lo largo de las observaciones se anotó cualquier otra incidencia que tuviera lugar, como los primeros cantos de los machos y los intentos fallidos de cópula.

En el caso de que tras los noventa minutos la pareja no hubiera copulado se detenía la observación directa y se dejaba varios días en condiciones estándar. Si aparecían larvas se registraban en una nueva clase llamada “cópula a partir de noventa minutos”. La ausencia de larvas se registro como “sin cópula”.

El bajo nivel de cópula en *D.koepferae*, hizo que fueran observadas nuevamente las poblaciones de esta especie utilizando en vez de parejas grupos de diez machos y diez hembras. La cuantificación por parejas no es factible, por lo que las observaciones se refieren al momento en el que se observaba las primeras cópulas. También se realizó esta última experiencia con diez machos *Drosophila buzzatii* agrupados con diez hembras *D.koepferae*

Proporción de cópulas

Se agruparon las cincuenta parejas de cada población en dos categorías: “cópula” y “sin cópula”. Se cálculo el tanto por ciento de parejas y mediante tests chi cuadrado de homogeneidad se contrastaron dos hipótesis:

- a) H_0 : la proporción de cópulas es homogénea entre especies
- b) H_0 : la proporción de cópulas es homogénea dentro de cada especie

Comienzo de la cópula

Los datos se agruparon en clases de diez minutos de cero a noventa minutos más una clase referida a “cópula a partir de noventa minutos” y otra a “sin cópula”. Se realiza un acercamiento gráfico mediante histogramas y contrastamos:

- a) H_0 : el comienzo de la cópula sigue una distribución normal: usamos un test de Kolgomorov-Smirnov
- b) H_0 : el comienzo medio es asimilable en las distintas especies: usamos un análisis de varianza (test preliminar de Levene y como consecuencia, otro de Krustal-Wallis)
- c) H_0 : el comienzo medio es asimilable las distintas poblaciones de cada especie: empleamos un análisis de varianza similar al anterior apartado, pero separando los datos de cada especie por separado.

Duración de la cópula

Se realizó simultáneamente con el anterior, con las mismas poblaciones y los mismos individuos. Se midió el tiempo en segundos de la cópula considerada desde el acoplamiento hasta la separación de cada una de las cincuenta parejas de cada población dentro de cada especie

Los datos fueron sometidos a contrastes para comprobar dos hipótesis

- a) H_0 : comportamiento normal en cada población. empleando un test de Kolgomorov-Smirnov
- b) H_0 : la duración media es igual en las distintas especies: usamos un análisis de varianza (test preliminar de Levene y como consecuencia, otro de Krustal-Wallis)
- c) H_0 : la duración media es asimilable las distintas poblaciones de cada especie: con análisis similar a lo ya visto.

OBTENCIÓN DE CRUZAMIENTOS HÍBRIDOS F₁

Para conseguir el cruzamiento entre ambas especies se intentaron la mayor cantidad de combinaciones posibles de los siguientes factores:

1. Temperatura:
 - a. Ambiente
 - b. Controlada (en cámara de cría), a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
2. Medio de cultivo: como se describe más arriba, comercial, tradicional y tradicional enriquecido con todas las variaciones posibles
3. Número de individuos: de uno a varias decenas
4. Relación numérica entre especies: desde una ratio 1:1 a una proporción 1:100, tanto en un sentido sexual (machos *D. koepferae*: hembras *D. buzzatii*) como en el opuesto
5. Tipo de contenedor de cultivo, desde pequeños viales a botellas de tamaño medio y cajas de poblaciones
6. Factores hormonales o de otro tipo: se siguieron dos estrategias:
 - a. Situando individuos de una especie dentro del contenedor de cultivo separados por barreras físicas del resto de los individuos, permitiendo el paso de aire y posibles factores de tipo volátil, auditivo o visual hacia los cruces interespecíficos
 - b. Manteniendo juntos individuos del mismo sexo pero de distintas especies durante 24 horas, y luego realizando el cruzamiento interespecífico, para intentar la adhesión de posibles factores de superficie
 - c. Realizando cruzamientos con machos ya experimentados

Las distintas posibilidades de combinación entre todos estos factores fueron realizadas hasta un total estimado de alrededor de cinco mil replicas para conseguir la descendencia F₁.

Una vez conseguidos éxito en los cruces F₁ para confirmar el cruzamiento, larvas macho fueron diseccionadas y observados sus cromosomas, que presentan (en caso de ser positivo) un desapareamiento entre homólogos a lo largo de todos y cada uno de los cromosomas

Selección de fragmentos

Una vez obtenida la F₁ híbrida, se retrocruzaron las hembras con *D. buzzatii* San Luis de las isóneas 6 white⁺ o 101 white (los machos híbridos F₁ son siempre estériles, con testículos extremadamente atrofiados). Para confirmar la naturaleza de estos retrocruzamientos se diseccionó alguna larva de tercer estadio (para comprobar la asinapsis cromosómica) o algún macho adulto (para comprobar atrofia testicular). A estos cruces se les denominó R₁

Conseguidos las R_1 , se repitieron los cruzamientos con *D. buzzatii* en lo que se denominaron $R_{2, 3...n}$. En cada paso, la recombinación va reduciendo y barajando los fragmentos de *D. koepferae*: sobre un fondo genético de *D. buzzatii*.

Tras varias generaciones se obtienen una colección de individuos que portan distintas zonas de cromosoma de una especie en otra, reconocibles y localizables por disección de larvas, extracción de glándulas salivares y posterior observación de cromosomas politénicos

Para la selección de los fragmentos para su estudio se priorizaron los siguientes criterios:

1. Tamaño: se intentó cubrir desde el fragmento más pequeño (que coincide con los extremos debido a la técnica de observación) hasta el mayor posible.
2. Localización: se intentó cubrir la totalidad del cromosoma con fragmentos solapantes o contiguos.

Cada fragmento se caracterizó por la posición en el mapa citológico (Ruíz, 1992) de la primera y la última banda en la que se observaba asinapsis a 400 aumentos en los microscopios Olympus BX-50 o CH-2.

Hay que esperar que los fragmentos sean levemente mayores por efecto de la limitada resolución de la técnica de observación. El mapa de referencia que se ha seguido se ilustra a continuación, y se corresponde a *D. repleta*, (Wharton, 1942), común a todo el grupo

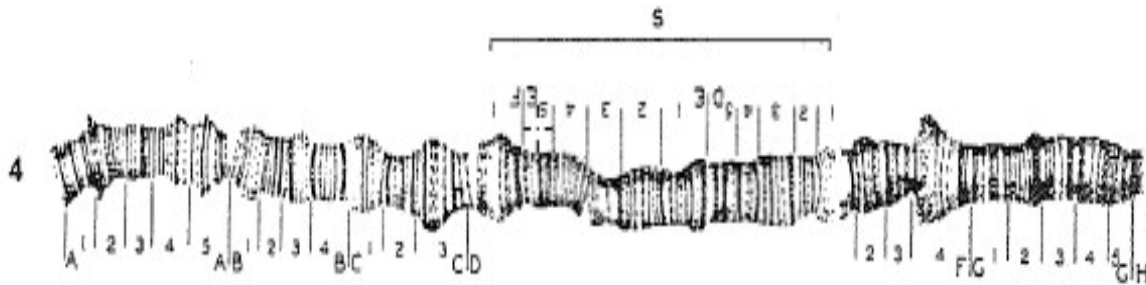


OBTENCIÓN DE LÍNEAS HOMOCIGOTAS

Una vez seleccionado un fragmento de interés se intentó fijarlo en homocigosis mediante un sistema de cruzamientos controlados.

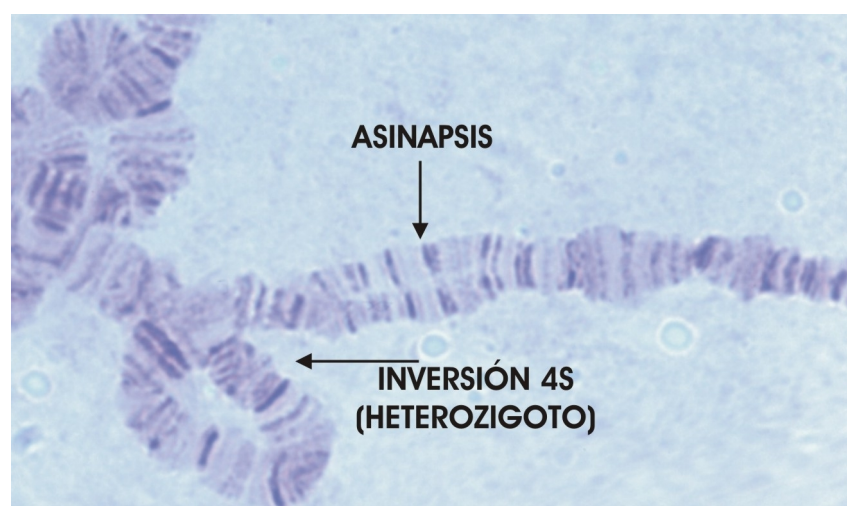
Para averiguar el tipo de cruzamiento se emplearon como marcadores cromosómicos:

- 1) Presencia o ausencia de introgresión, distinguible por la aparición o no de asinapsis
- 2) Presencia o ausencia de la inversión 4s, que comprende el intervalo 4D1-F1 (Ruiz, 1984), distinguible por la aparición de un bucle de inversión (en heterocigosis) o de la ordenación cromosómica invertida (inversión en homocigosis)

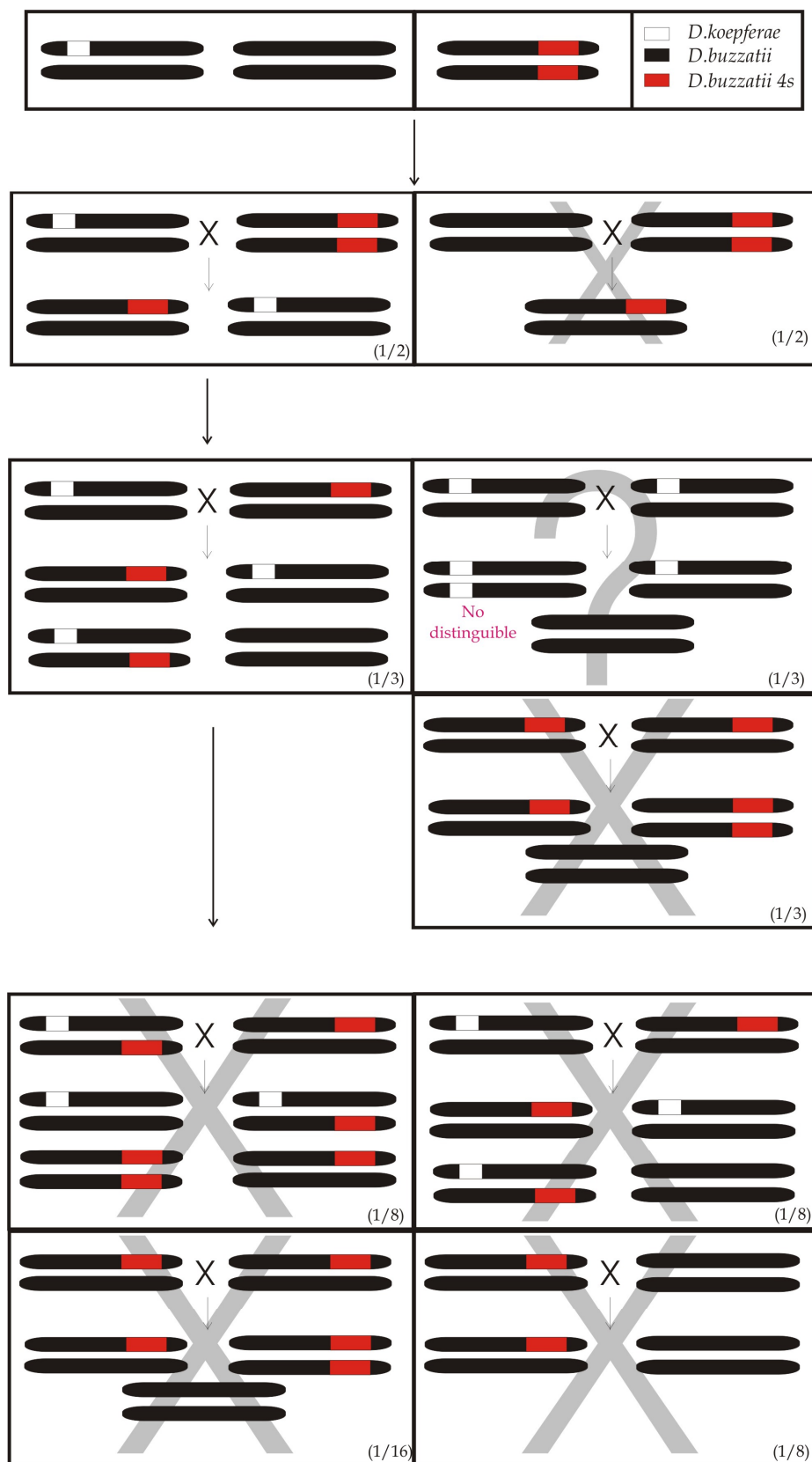


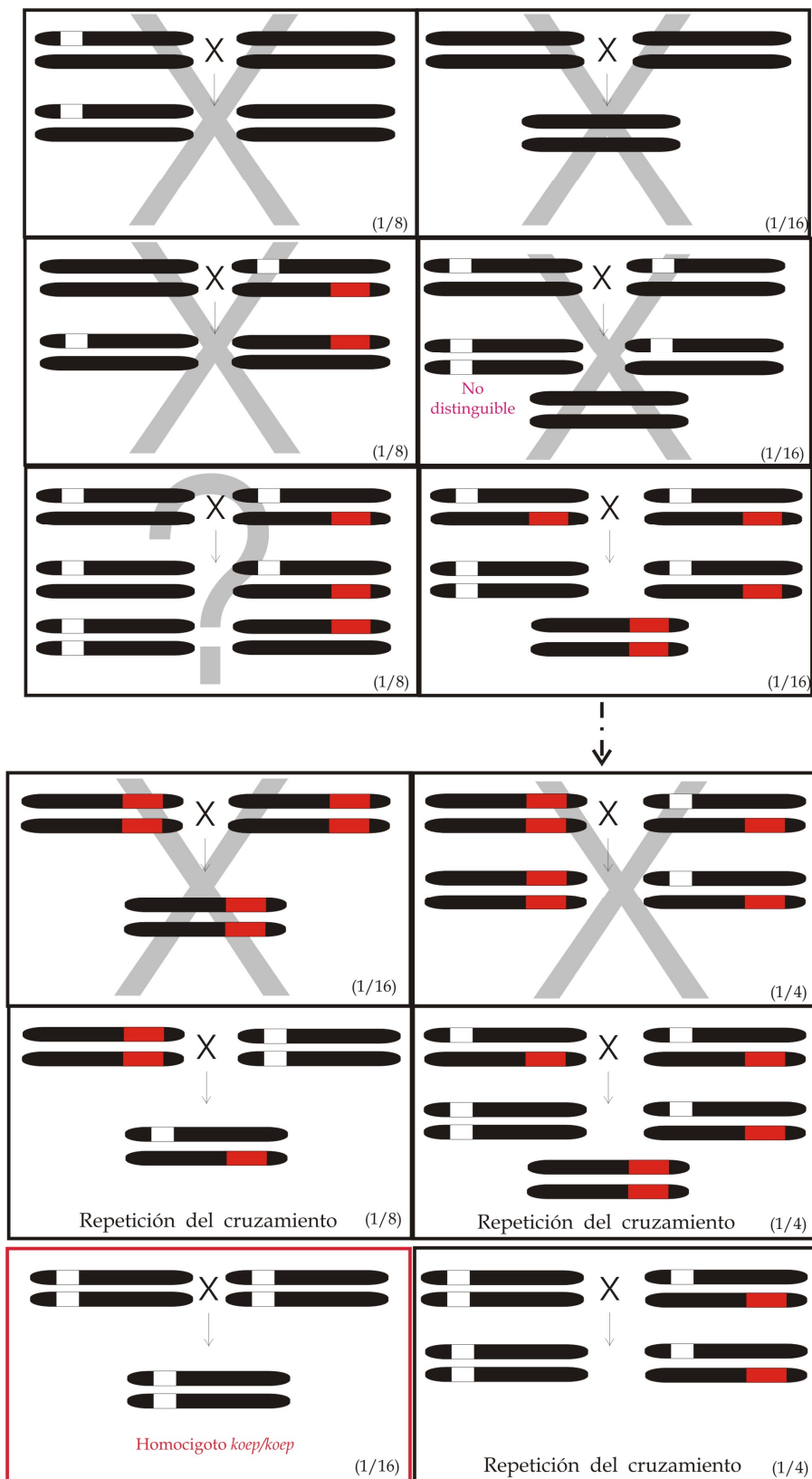
Representación esquemática de la inversión 4s/s Modificado a partir de Ruiz, 1984.

Estos marcadores se reconocían al hacer disección de larvas, extracción de glándulas salivares y posterior análisis de cromosomas politénicos



El objetivo final sería llegar a un cruce entre dos homocigotos para el fragmento de *D. koepferae* en cuestión. Utilizamos el siguiente esquema de cruzamientos





Cuadro superior, tipos paternos, / Resto: tipos de cruzamientos con su probabilidad entre paréntesis
 ?= diagnóstico imposible o poca probabilidad / X = rechazo

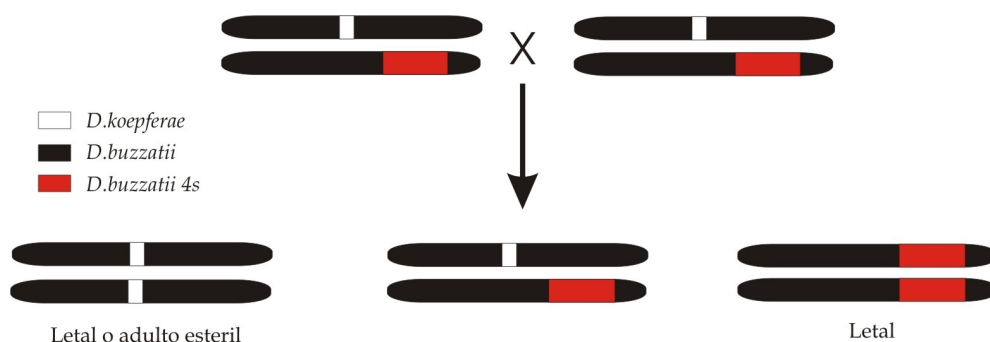
La confirmación del homocigoto para un determinado fragmento se realizó cruzando individualmente algunos descendientes con *D. buzzatii* y analizando cada cruce mediante la disección de diez larvas, extracción de sus glándulas salivares y posterior análisis de cromosomas politénicos. Todas las larvas deben mostrar asinapsis en el fragmento seleccionado para ser considerado como positivo.

Con los primeros descendientes de esos cruces confirmados se establecieron dos cruces masales. Uno de ellos se conservó en una cámara de ambiente controlado a 23°C y el otro en las condiciones variables del laboratorio.

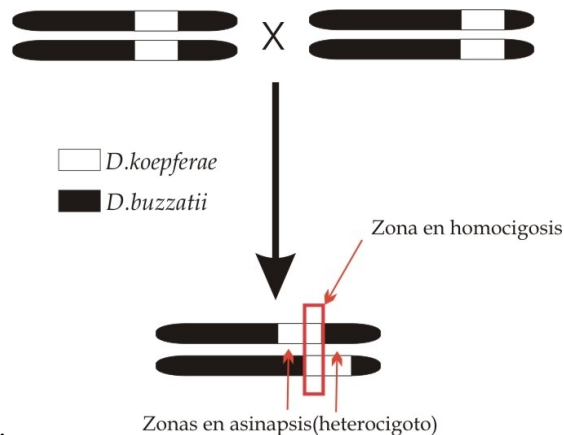
La razón de esta separación es doble: se establecen réplicas que garantizan la continuidad frente a un imprevisto, accidente o contaminación, especialmente sensible por la debilidad de los individuos con fragmentos en homocigosis. Por otro lado permite la comparación entre los datos experimentales de ambas, uniformes genéticamente en su principio, ante el aislamiento durante muchas generaciones (en algún caso de 300 generaciones). La coincidencia entre réplicas permitiría descartar factores ambientales y evidenciar la posible causa genética de las anomalías encontradas.

Letales psedoequilibrados

En enero de 2000, mientras se intentaba poner en homocigosis uno de los fragmentos (4B3-C2) apareció dentro de la inversión 4s/s un cambio que llevaba a letalidad en las moscas homocigotas. Esta característica se seleccionó porque permitía reducir el número de tipos de descendencia posibles, facilitando la puesta en homocigosis de las introgresiones. Además en las líneas en las que resultó imposible la fijación, este letal se mostró de gran utilidad al comportarse la combinación 4 s letal/introgresión como una cepa de letales equilibrados, lo cual permitía su mantenimiento en relativa estabilidad y toleraba una aproximación a la causa de esa imposibilidad



En los fragmentos solapantes se cruzaron individuos portadores de cada segmento entre sí. Uno de los genotipos posibles era sin duda el homocigoto, que además se reconoce en observaciones microscópicas por la presencia en asinapsis de la porción no solapante

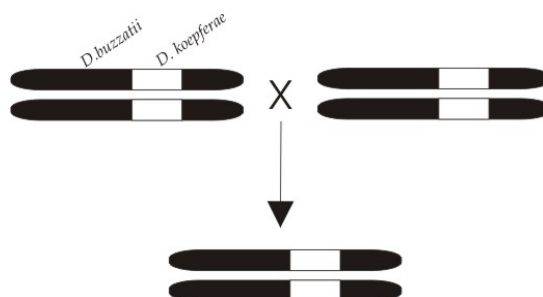


Arquitecturas cromosómicas propuestas

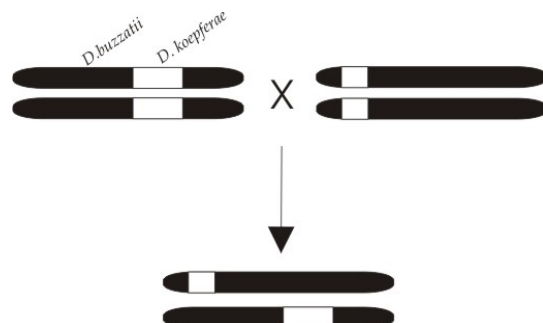
A partir de la estabilización de las líneas se comenzó a estudiar las posibles implicaciones que la distinta colocación de los fragmentos entre si podrían tener en aspectos habitualmente estudiados y que se relacionan con una medida parcial de la *fitness* del organismo.

A nivel general se establecieron tres agrupaciones en los experimentos, atendiendo al distinto planteamiento cromosómico de progenitores o descendencia, a saber:

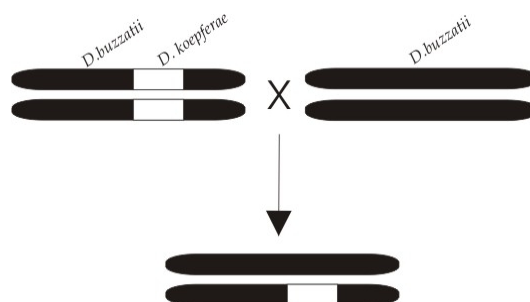
- Cruzamientos entre homocigotos con el mismo fragmento: progenitores y descendencia presentan la misma estructura cromosómica



- Cruzamientos entre homocigotos con distinto fragmento: se produce descendencia con dobles fragmentos cromosómicos ajenos en heterocigosis posición *trans*. La cantidad de cromosoma introgresada es similar al anterior grupo, pero su organización es distinta.



- c) Cruzamientos entre homocigotos con la cepa de referencia *D. buzzatii* San Luis de las isolíneas 6 white⁺ o 101 white: se produce descendencia con fragmentos cromosómicos ajenos en heterocigosis, sencillos. La cantidad de material ajeno suele ser menor que en las dos anteriores. En este caso existen estudios extensivos que describen el comportamiento de fragmentos de cromosomas introgresados en heterocigosis. Nuestro planteamiento es ligeramente distinto, puesto que el origen de nuestras introgresiones en heterocigosis proviene de líneas homocigotas. Es posible, por tanto, que problemas inherentes a estas líneas influyan en la *fitnes* de sus descendientes, pese a tener los genes implicados en la introgresión en heterocigosis



Los apartados siguientes frecuentemente realizarán análisis referenciados a la cantidad de material introgresado. Se calculó de manera simple dividiendo la longitud lineal de las bandas que presentaban asinapsis dividida por la longitud total del cromosoma (Matute, 2010). La longitud total del cromosoma se refiere a la suma de ambos homólogos, con objeto de hacer la proporción más realista respecto a un mismo fragmento colocado en homocigosis o en heterocigosis. En el caso de homocigotos, se multiplica por dos al tener doble copia del mismo fragmento. Debe entenderse, por tanto, que los porcentajes se toman respecto a la dotación haploide del cromosoma cuatro en su conjunto.

No se consideraron factores como las posibles irregularidades de densidad génica debida a diferencias estructurales o a cualquier otra causa pues introduciría factores de variabilidad discutibles. Asumimos, por tanto, una compensación media de esos efectos que no sesgaría los cálculos

ESTUDIO DE LA FERTILIDAD

Se separaron 25 machos de seis horas como máximo desde la eclosión y se mantuvieron vírgenes veinticuatro, cuarenta y ocho, setenta y dos o noventa y seis horas. Transcurrido este tiempo se diseccionaron los individuos en solución salina, se extrajeron sus testículos con la vesícula seminal e inmediatamente se observaron al microscopio en contraste de fases. Se registraron las siguientes posibilidades:

- Testículos con esperma (s): aquellos en los que el esperma móvil rellenaba la vesícula seminal en abundante cantidad. Se considera por tanto que el macho de esa edad ya era fértil
- Testículos en desarrollo (s*): aquellos en los que se observa la vesícula seminal vacía, pero al realizar un ligero aplastamiento de la preparación aparecía alguna pequeña cantidad de esperma móvil. Se supone que esta etapa representa una fase de transición entre el juvenil y el adulto fértil perfectamente formado y se asimilan a la fertilidad completa en los análisis.
- Testículos sin esperma (n): aquellos en los que se observa la vesícula seminal vacía y no hay esperma móvil ni siquiera tras realizar un ligero aplastamiento de la preparación. Se considera que el macho o bien es demasiado joven para haber desarrollado esperma, o bien es estéril.
- Testículos atrofiados (a): aquellos que presentaban alguna malformación evidente y que no presentaban esperma

Este protocolo de actuación se aplicó a los siguientes cruzamientos:

1. Cruzamientos control de líneas utilizadas (descendencia salvaje):
2. Cruzamientos entre homocigotos con el mismo fragmento (descendencia híbrida homocigota):
3. Cruzamientos de homocigotos con distinto fragmento (descendencia doble heterocigota en trans) se cruzaron machos y hembras de cada línea homocigota, cubriendo todas las posibilidades, incluso los cruzamientos recíprocos macho (A) x hembra (B) y macho (B) x hembra (A). En los casos en los que el tamaño de la introgresión resultante fuera máximo, mínimo o medio se diseccionaron 25 individuos. Al observar un comportamiento homogéneo, en el resto de los cruces se emplearon sólo 10 individuos, intentando detectar alguna desviación puntual del comportamiento observado

Tras las observaciones se agruparon en clases de edad y se compararon las distintas líneas utilizadas usando un tratamiento gráfico mediante diagramas de barras en los que se relacionaron la cantidad de machos sin esperma con la edad aproximada desde salida de la pupa y la cantidad de material introgresado.

Con el comportamiento sugerido por los diagramas se diseñó un estadístico basado en una ecuación de recta según el modelo

$$\frac{y - y_1}{x - x_1} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

donde x_1 , x_2 son los porcentajes de machos sin esperma en las clases anteriores y posteriores al 50%

y_1 , y_2 son el tiempo en horas en las clases anteriores y posteriores al 50%

Al obtener las ecuaciones de cada clase se les aplicó una $x = 50\%$ para estimar cuantas horas tardarían el 50% de machos de esa línea en ser fértiles. Con los datos de todas las clases se calculó un coeficiente de correlación lineal respecto al tamaño introgresado en cada cruzamiento homocigoto y heterocigoto por separado. También se diseñó un diagrama de dispersión para homocigotos y heterocigotos con estos datos

Se diseñó un nuevo acercamiento más fino temporalmente ajustando las observaciones al tiempo esperado en el que los individuos heterocigotos desarrollaban su esperma móvil, incluso previo a su desplazamiento hacia la vesícula seminal. Para ello se hicieron cruces de 10x10 individuos de líneas homocitas que aportaban gran tamaño cromosómico introgresado (4E1-E5(W)(W) y 4A4-B3(II)) y el mínimo posible (4C2-C3 y 4A1), confrontándolas con la cepa salvaje original de *Drosophila buzzatii* San Luis (6). Para evitar efectos sexo-dependientes se duplicaron cruces del tipo macho línea 1 x hembra línea 2 y macho línea 2 x hembra línea 1.

Al llegar a adultos la descendencia se separó a la lupa diariamente a las 10 y 16 horas, colocando los machos vírgenes en viales aislados hasta las 16 horas del día siguiente. Como este experimento se realizó durante la primavera y el verano, con un amanecer medio a las 7 horas, podemos concluir que el primer grupo de machos tendría aproximadamente entre 24 y 30 horas, y el segundo entre 30 y 33.

Estos machos fueron anestesiados hasta la muerte, sus testículos extraídos en solución salina al 0'9%, colocados en una gota de la misma solución entre cubreobjetos y portaobjetos, realizando un ligero aplastamiento previa a su observación al microscopio repetidamente citado, en contraste de fases.

Se establecieron dos categorías fértil o estéril según se observara algún esperma móvil o no, que se agruparon según su edad y el cruzamiento de procedencia. Con todos estos datos se contrastó las siguientes hipótesis nulas mediante distintas χ^2 de homogeneidad:

1. H_0 : ambas especies forman su esperma simultáneamente
2. H_0 : los híbridos homocigotos se comportan como la especie salvaje (*D. buzzatii*)
3. H_0 : los híbridos dobles heterocigotos *trans* se comportan como la especie salvaje (*D. buzzatii*)
4. H_0 : Los híbridos dobles heterocigotos se comportan de manera homogénea

Atrofia testicular

El análisis de este fenotipo concreto se ha realizado de manera independiente debido a su rareza. Se ha intentado comprobar su estabilidad respecto a condiciones como edad, ambiente o duración temporal de la anomalía en la línea estudiada. Se analizaron testículos de machos de seis clases: de 24, 48, 72 y 96 horas y

de edades variadas procedentes de distintas condiciones ambientales. La sexta clase se recogió meses después del resto. Con los datos obtenidos se contrastó la hipótesis:

H_0 : Las distintas series tienen igual proporción de testículos atrofiados.

Se comprobó su veracidad mediante una χ^2 de homogeneidad

ESTUDIO DE LA RATIO SEXUAL

Se han escogido dos tipos de acercamientos para investigar este problema. En este capítulo realizamos un análisis tomando la desigualdad de la proporción sexual como medida de la falta de individuos de uno u otro sexo.

Este planteamiento permite detectar fenómenos sexo dependiente, pero no discrimina la inviabilidad de otros efectos, ni la general en ambos sexos. En el siguiente capítulo ("estudio de la productividad") se abordará ese vacío midiendo la inviabilidad neta total como diferencia respecto a la población original de partida

Comenzamos estableciendo las categorías de cruces atendiendo a su arquitectura genética (ya empleadas anteriormente)

Cruzamientos control (descendencia salvaje):

Se realizaron recuentos sexuales de adultos y larvas descendientes de cruces masales de las líneas que pudieran tener una relación con las líneas en homocigosis. Concretamente:

- *D. buzzatii* San Luis 6 (salvaje)
- *D. buzzatii* San Luis 101 (white)
- *D. buzzatii* San Luis (inversión 4s/s fijada)
- *D. koepferae* San Luis 8

También se realizaron cruzamientos control entre *D. buzzatii* San Luis 6 (salvaje) x *D. buzzatii* San Luis 101 (white) en ambos sentidos sexuales por ser estas las cepas que habitualmente tomamos como referencia respecto a los híbridos

El número de descendientes contados fue siempre superior a 250 individuos adultos. Además se sexaron 150 larvas por cruzamiento Se pretende comprobar que no existe ningún factor en las cepas originales que influya en la proporción entre los sexos.

Cruzamientos entre homocigotos con el mismo fragmento (descendencia homocigota):

Se realizaron recuentos sexuales de adultos y larvas descendientes de cruces masales de las líneas con fragmentos en homocigosis.

Para comprobar el posible error debido a variaciones de temperatura o ambientales en general, se realizaron dos recuentos: el primero sobre una réplica en una cámara a temperatura controlada de 23°C, y el segundo sobre otra réplica a temperatura ambiente (entre 18-30°C). Ambas copias llevaban varias generaciones separadas. El número de descendientes contados fue aproximadamente de 250. Se sexaron 150 larvas por cruzamiento

Cruzamientos entre homocigotos con distinto fragmento (descendencia doble heterocigota en trans)

Se cruzaron 10 machos con 10 hembras de cada uno de los fragmentos homocigotos, cubriendo todas las combinaciones posibles de machos y hembras. Se cambiaron a medio fresco cada 3-4 días y se contaron machos y hembras de la descendencia. Se repitieron el protocolo hasta que el número de descendientes contados fue aproximadamente de 250 adultos y 150 larvas por tipo de cruzamiento

Se realizaron dos pruebas independientes similares en adultos

Cruzamientos de homocigotos con la cepa salvaje de referencia (descendencia heterocigota simple)

Se cruzaron 10 machos/hembras de cada uno de los fragmentos anteriores con 10 hembras/macho de *D. buzzatii* San Luis 101 (white). Se cambiaron a medio fresco cada 3-4 días y se contaron machos y hembras de la descendencia.

Se analizaron tanto adultos de la descendencia como larvas, que fueron sexadas y devueltas al medio para completar su desarrollo. El número de descendientes contados fue como media aproximada de 250. Se sexaron 150 larvas por tipo de cruzamiento.

El mismo protocolo se repitió con cruces respecto a *D. buzzatii* San Luis 6

Los cruzamientos en todos los casos fueron realizados con el mismo medio de cría, a temperatura estable de 23°C y autenticando cada tipo de cruzamiento mediante disección de larvas, observación de cromosomas politénicos y localización de las asinapsis correspondientes. El recuento no se produjo en ningún caso el mismo día, sino que se tomaron parciales en días sucesivos que evitaban un sesgo debido a un desarrollo precoz de alguno de los dos sexos

Análisis

Homogeneidad:

Para comprobar si las distintas pruebas se comportaban de igual manera se realizó un test de homogeneidad². Se aplicó a la comparación de homocigotos a distintas temperaturas y a las dos pruebas de los heterocigotos. Para comprobar si las diferencias son significativas o no se aplicó un doble acercamiento: uno clásico, con rechazo de la hipótesis nula si $P < 0.05$, y otro aplicando una corrección secuencial de Bonferroni (Holm, 1979; en Rice, 1988)

Contraste de muestras procedente de poblaciones de proporción sexual del 50%:

Se contrasto mediante una ² la siguiente hipótesis:

H_0 : el número de machos es igual al número de hembras

Para contrastarlo se utiliza el parámetro:

$$n^{\circ} machos = \frac{descendencia(total)}{2}$$

La abundancia de cruces hace que la probabilidad de un falso rechazo a un determinado nivel de significación aumente. Es por eso que se utiliza de nuevo la corrección secuencial de Bonferroni

Cuantificación de las diferencias:

En el caso de inviabilidad parcial de un sexo, el parámetro anterior la subestima, pues uno de sus sexos componentes cuenta con resultados menores a los esperados y esto influye en el total. Para corregir este defecto en los cruzamientos que presenten desviaciones significativas la cuantificación del sexo minoritario se realizó tomando el parámetro

$$g = \frac{n^{\circ} machos}{n^{\circ} machos + n^{\circ} hembras}$$

Este parámetro toma resultados entre 0 y 1. Valores entre 0 y 0,5 denota falta de machos, y entre 0,5 y 1, exceso

Causalidad

Transformamos el valor g de dos maneras: usando $g-0,5$ para normalizar el valor respecto al sexo; y $|g-0,5|$ para evitar que el signo enmascare la magnitud real de las diferencias.

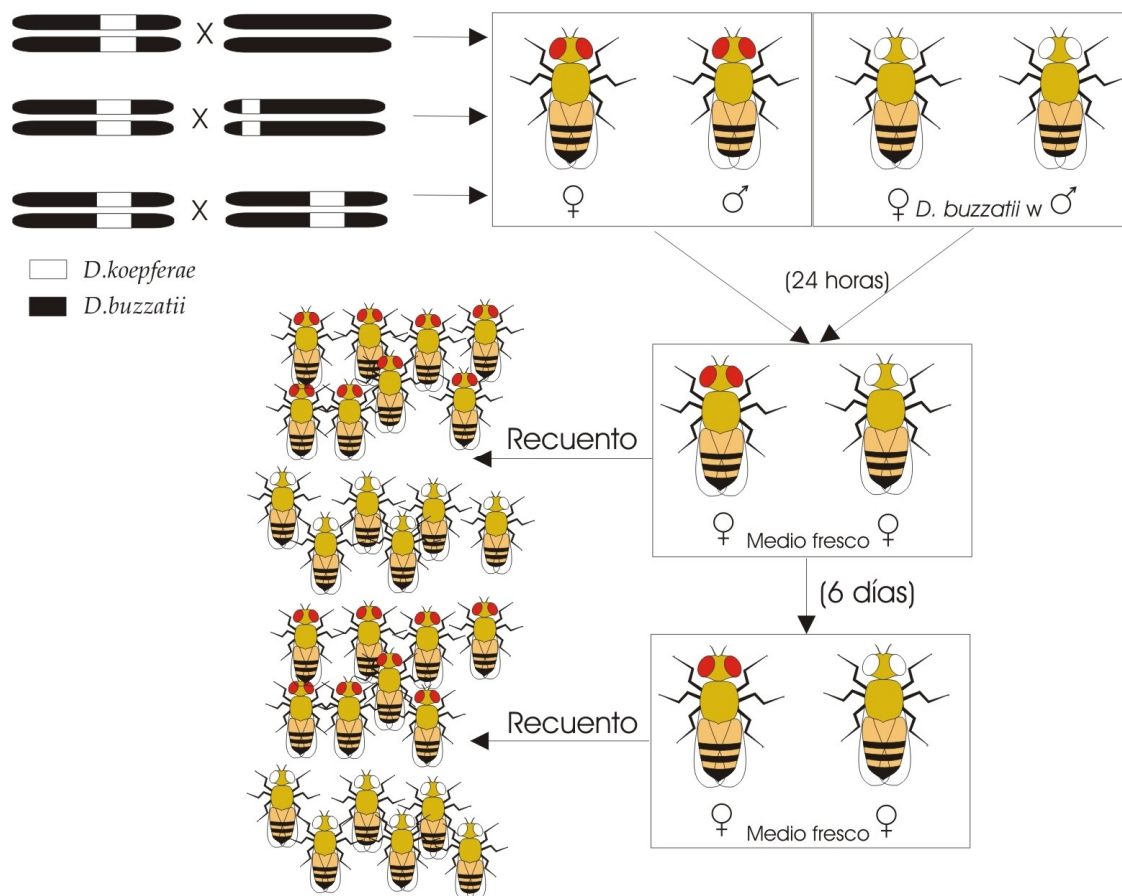
Ambas transformaciones se representaron gráficamente frente a la cantidad de cromosoma introgresado para intentar reflejar si existe una correlación, comparando los datos de homocigotos, dobles heterocigotos en *trans* y heterocigotos simples en los estados de larvas, adultos, y con los datos compendiados.

ESTUDIO DE LA PRODUCTIVIDAD

Se aborda como un intento de medir la *fitness* total de las líneas con algún fragmento introgresado respecto a las poblaciones de las especies salvajes de las que provienen. El objetivo es tener una visión lo más general posible de la influencia del material genético extraño por posición, arquitectura genética o cantidad, sobre las verdaderas capacidades de estos individuos en un ambiente de competencia natural. Indirectamente nos permite detectar líneas de inviabilidad en ambos sexos.

Se separaron diez machos y diez hembras vírgenes de la línea a estudiar y se mantuvieron separados para garantizar su desarrollo hasta adulto. Paralelamente se realizó el mismo protocolo con la población salvaje de procedencia con color de ojos distintos (*Drosophilla buzzatii* San Luis 6 *white*⁺, o *Drosophilla buzzatii* San Luis 101 *white*).

Tras este tiempo se unen machos y hembras de la línea problema e independientemente, de la población de referencia, durante 24 horas para asegurar su cruzamiento.



Pasado este período se anestesian levemente las moscas con CO₂ y se separan machos y hembras. Inmediatamente las hembras fecundadas a estudiar y las de la población de referencia se pasan a medio fresco en el mismo recipiente. A los seis días, sin anestesiarse, se cambian a medio fresco y se cuantifican y anotan las hembras de cada clase que todavía sobreviven. A los siguientes seis días las moscas se desechan.

Tras el desarrollo de la descendencia, se cuantifican su número según su procedencia, que se reconoce utilizando como rasgo distintivo su color de ojos. Excepto en los individuos de la cepa homocigota E1-E5(w), que presentan mutación *white*, por lo que en los cruces en los que intervinieron hembras de esta cepa sólo se tuvieron en cuenta para el análisis las hembras de la descendencia, al ser los machos indistinguibles de los de la cepa de referencia

Estas pruebas se realizaron con las líneas siguientes:

- a) Cruzamientos control(descendencia salvaje) tomadas como referencia
- b) Cruzamientos entre homocigotos con el mismo fragmento(descendencia homocigota):
- c) Cruzamientos entre homocigotos con distinto fragmento(descendencia doble heterocigota en trans)
- d) Cruzamientos de homocigotos con la cepa salvaje de referencia (descendencia heterocigota simple)

Una vez completado este experimento con todas las líneas se establece un análisis entre la descendencia planteándose las siguientes cuestiones:

¿Existen diferencias significativas entre las dos series experimentales correspondientes al primer y segundo tubo?

Se realizó un acercamiento gráfico seguido de análisis de correlación y varios tests de rangos de Wilcoxon cubriendo todas las posibles hipótesis, tanto de diferencias entre primera y segunda serie como de diferencias entre híbridos y salvajes entre ambas series.

Se repitieron todos los análisis estadísticos utilizando como parámetro de análisis la descendencia calculada por hembra en vez de totales. Se corrige así la posibilidad de que una mayor longevidad de las hembras de una determinada categoría sesgue los resultados.

¿Influyen las condiciones experimentales en las proporciones sexuales?

Se contrastan mediante una χ^2 de homogeneidad la posibilidad de que la proporción sexual se comporte de manera distinta entre el primer y el segundo tubo, aplicando según los casos la corrección de Yates o el test exacto de Fisher.

Tras análisis gráficos se emplea el parámetro g-0'5 (página 91) y un coeficiente de correlación lineal para contrastar si la densidad poblacional determina la proporción sexual.

¿Son equiparables los datos de proporciones sexuales obtenidas con o sin competencia de las poblaciones salvajes?

Comparamos los datos obtenidos en este apartado con los del capítulo de inviabilidad mediante test chi-cuadrado de homogeneidad, aplicando una corrección secuencial de Bonferroni (Rice 1988). Mediante un test de signos contrastamos si existe una tendencia en los cruces donde pudieran encontrarse diferencias.

¿Influye la arquitectura genética de los híbridos en la productividad?

Se analizaron los datos nuevamente pero separados por categorías (homocigotos, heterocigotos simples y dobles) primeramente con un acercamiento gráfico, seguido con el cálculo de un coeficientes de correlación respecto a la descendencia total.

Tras el análisis de correlación contrastamos la igualdad de medias entre categorías, escogiendo el test de Krustal-Wallis o ANOVA tras comprobar su idoneidad con test de normalidad (test de Kolgomorov-Smirnov) y test de igualdad de varianzas de Levene.

Se aplica también análisis de rango post hoc de Games-Howell para descubrir el origen de las diferencias.

ESTUDIO DEL DESARROLLO

Durante la realización de las anteriores investigaciones se observaron ocasionalmente la aparición de individuos que presentaban alguna anormalidad en su desarrollo. Ante la repetición de este hecho decidimos cuantificar y estudiar estas deformaciones desde varios puntos de vista:

- a) Descripción de los fenotipos (tipología)
- b) Asociación de la deformación con una zona cromosómica concreta (asignación).
- c) Estabilización de la anormalidad mediante un protocolo clásico de cruzamiento (fijación).
- d) Análisis numérico de las deformidades (cuantificación)
- e) Descripción de patrones (causalidad).

Tipología

Se realizaron descripciones de cada anormalidad morfológica, se agruparon por similitud física y se realizó un catálogo fotográfico usando una Konico-Minolta G-600, acoplada mediante un adaptador a una de las lupas Olympus modelos SZ-30 y SZ-40 en un rango de 30 a 40 aumentos

Asignación

Se catalogaron las deformaciones descritas en el apartado anterior relacionándolas con el tipo de cruzamiento en las que se producen. Se categorizan siguiendo el criterio general de este trabajo en cruces entre homocigotos iguales (descendencia homocigota), entre homocigotos distintos (dobles heterocigotos trans) y retrocruces (heterocigotos sencillos). También se incluyen las líneas de letales *pseudoequilibrados*, que no incluimos en los otros apartados de este trabajo por la heterogeneidad de su descendencia.

Fijación

La mayoría de las deformaciones conllevaron una esterilidad *de facto* por afectación de los órganos reproductores o por longevidad reducida. Se intentó conseguir la fijación de una alteración en una línea que expresara esta modificación en todos sus individuos y que además llevara material introgresado en homocigosis

Se escogió por tanto una deformación de alas curvadas similar a la mutación *curly*, que aparecía entre otros en el fragmento 4 C2-C3. Se cruzaron por parejas los individuos que expresaban este fenotipo y también entre machos de alas curvadas con sus hermanas que no lo expresaban y cruzamientos recíprocos, así como entre individuos que, no manifestando la alteración, provenían de progenitores que si las presentaban.

Este diseño se mantuvo durante al menos seis generaciones.

Cuantificación

Se intentó analizar estadísticamente la aparición de anomalías en el desarrollo para desvelar patrones de comportamiento. Para ello se realizaron recuentos de un mínimo de 200 adultos de las poblaciones salvajes de referencia *Drosophila buzzatii* (6) y *Drosophila koepferae* (8), ambas de San Luis y, paralelamente al anterior, de cada una de las cepas homocigotas para cada introgresión, registrando número y tipo de deformaciones que aparecían.

En el caso de heterocigotos dobles y simples se establecieron cruzamientos de diez por diez individuos, cubriendo todas las posibilidades e incluyendo apareamientos recíprocos y se registraron los individuos de desarrollo alterado del total de descendencia obtenida. También se presentan los datos correspondientes a las líneas letales *pseudoequilibrados*

Los animales se mantuvieron a temperatura controlada en cámara a 23°C

Los resultados se exponen por tipo de deformación

Causalidad

Los resultados anteriores se compendian para analizar las siguientes cuestiones:

¿Influyen la introgresión en la aparición de alteraciones del desarrollo?

Para contrastarlo se realizó una χ^2 de homogeneidad comparando los datos de referencia de las especies salvajes frente a los híbridos

¿Existe relación entre tamaño de la introgresión y cantidad de deformidades?

Se construyó un diagrama de dispersión relacionando el porcentaje de deformidades respecto al porcentaje de material introgresado, seguido de un cálculo de coeficiente de correlación lineal y contraste de significación.

¿Induce una determinada arquitectura genética la presencia de anomalías?

Se realizó una comparación de medias entre los datos de homocigotos, heterocigotos dobles y simples. Se comprueba la normalidad de la distribución mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov y la igualdad de varianzas usando un test de Levene. Se escogerá el análisis de varianza ANOVA o un test de Kruskal-Wallis dependiendo de su bondad de ajuste seguidos de pruebas *post hoc* para detectar grupos divergentes.

¿Influyen las condiciones ambientales en el desequilibrio del crecimiento?

Se realizó un diseño experimental similar al anterior pero utilizando las líneas homocigotas que conservamos fuera de la cámara de cría, por tanto en condiciones ambientales variables, y se contrastará su

comportamiento similar respecto a las líneas criadas en cámara de cría controlada mediante una χ^2 de homogeneidad

Tras esto se intentó provocar un desequilibrio mayor sometiendo las *Drosophila* a un diseño experimento de choque térmico (*heat-shock*, Ashburner, 1989). Se usaron todas las líneas homocigotas más la población San Luis (6) salvaje de *Drosophila buzzatii* como referencia. Se establecieron dos temperaturas, una permisiva a 23° C y otra restrictiva del desarrollo a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)

Se separaron adultos vírgenes representantes de cada fragmento introgresado y se mantuvieron durante 24 horas separados para que alcanzaran su madurez sexual. Se juntaron entonces machos y hembras de cada categoría en viales independientes y se permitió el apareamiento durante otras 24 horas. Tras ellas los individuos adultos de cada población fueron pasados a viales con medio fresco durante seis horas para que pusieran huevos de manera lo más sincronizada posible.

Una vez hecho esto se establecieron dos estrategias. En la primera, cada una de las líneas fue introducida a temperatura restrictiva y pasada a la permisiva para que completara su desarrollo en intervalos diarios de cero a siete días. En la segunda se procedió de manera opuesta, comenzando el desarrollo a temperatura permisiva, y terminándolo a la restrictiva, con la misma secuencia temporal.

Finalmente se recontaron los adultos por sexos en cada línea y en cada intervalo temporal, así como las anormalidades morfológicas observadas.

Se contrastó mediante sendas χ^2 de homogeneidad si el distinto grado de exposición a temperaturas restrictivas es irrelevante en el porcentaje de individuos con alteración del desarrollo y si existe equivalencia entre un desarrollo completo a temperatura controlada y otro con dosis de temperatura restrictiva.

RESULTADOS

CORTEJO

Drosophila koepferae y *Drosophila buzzatii*, las dos especies objeto de este estudio, realizan una secuencia precopulatoria similar a muchos otros insectos: el macho busca a la hembra y se mueve a su alrededor realizando un “canto” mediante la vibración de sus alas. Si es aceptado comienza un lameteo con su trompa en los genitales de la hembra seguido de la consumación de la cópula.

Comportamiento general

La observación directa indica que ambas especies pese a realizar la misma secuencia presentan diferencias en la preparación y consumación de la cópula. Estas divergencias podrían explicar su prácticamente nulo cruzamiento interespecífico y su aislamiento reproductivo efectivo en la naturaleza.

Los machos *D.buzzatii* comienzan a representar la secuencia de cortejo inmediatamente después de encontrarse con las hembras en el mismo espacio, mientras que los de *D.koepferae* se mantienen indiferentes a su pareja durante mucho tiempo en los cruces individuales, siendo frecuente observar en las hembras un arqueamiento de las alas que no parece responder a operaciones de limpieza. Sin embargo cuando los cruces son de un número mayor de individuos los machos se comportan de una manera similar a los de *D.buzzatii*.

Este resultado es cualitativo y se sustenta en las observaciones directas de las parejas. Para analizar estas observaciones estimamos y contrastamos cuantitativamente estos resultados

Proporción de cópulas

Se muestra a continuación, el comportamiento de 50 parejas por población. Se refleja como “sin cópula” las que no tuvieron actividad reproductiva durante al menos 90 minutos de observación directa y que no dejaron tampoco descendencia en el tubo de cría.

	<u>Sin cópula</u>	<u>Cópula</u>	
<i>D. Koepferae</i> Argentina(88)	18	33	35,29%
<i>D. Koepferae</i> Argentina(58)	19	31	38,00%
<i>D. Koepferae</i> San Luis (8)	36	14	72,00%
<i>D. koepferae</i> Palo Labrado	15	35	30,00%
<i>D. buzzatti</i> San Luis (6)	7	43	14,00%
<i>D.buzzatti</i> _Carboneras	4	46	8,00%

Se contrasta:

H₀: La proporción de cópulas es homogénea entre especies

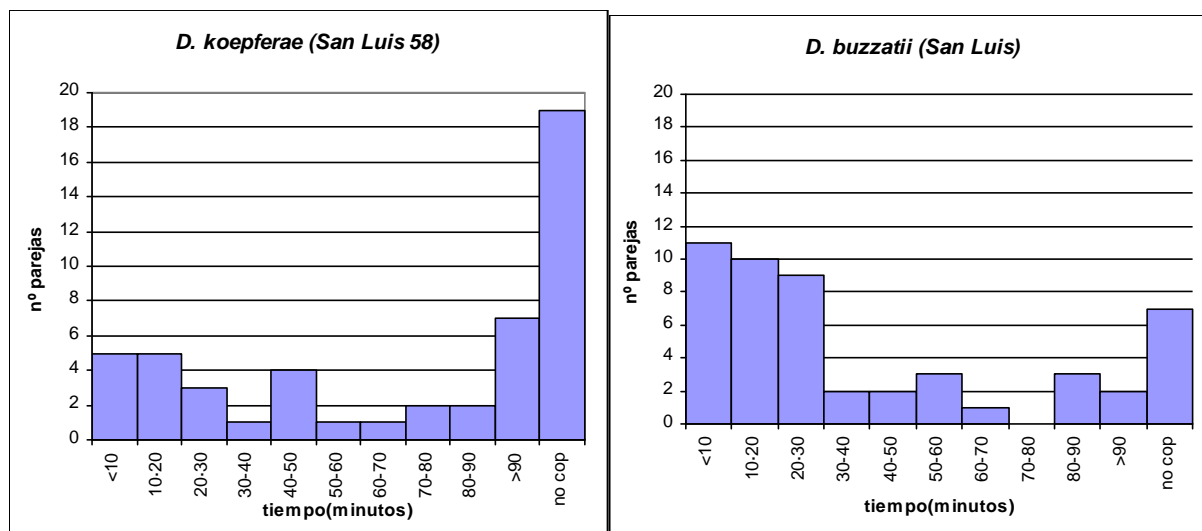
Se realizó una prueba chi-cuadrado de homogeneidad que proporcionó una probabilidad de suceso del 0.0000. Rechazamos por lo tanto la hipótesis de que las seis poblaciones se comporten de manera similar en este aspecto.

H₀: La proporción de cópulas es homogénea dentro de cada especie

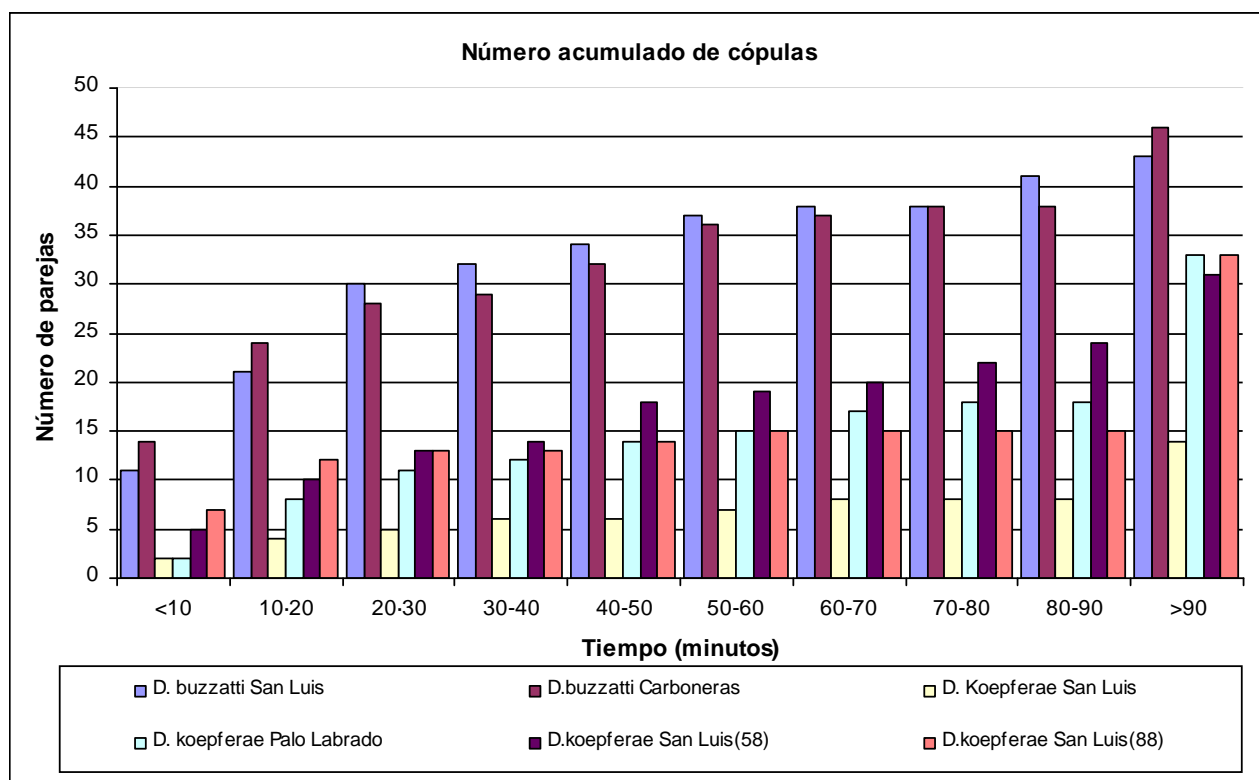
Nuevas ² devuelven un valor de probabilidad del 0.337 para las poblaciones de *D. buzzatii* y de 0.000 para *D. koepferae*. Debemos, por tanto, aceptar la hipótesis en el primer caso y rechazarlo en el segundo. De todas maneras, excluyendo la población de San Luis (8), las otras dos poblaciones de *D. koepferae* se comportarían de manera homogénea con valor P de la prueba igual a 0.692.

Comienzo de la cópula

Se representan a continuación las dos gráficas más significativas correspondientes a las especies y poblaciones analizadas. Se muestran el número de parejas agrupadas por clases de tiempo en el comienzo de la cópula.



El siguiente gráfico expresa datos de todas las poblaciones estudiadas de ambas especies, acumulando el número de parejas fecundadas frente al tiempo. Así expresadas se distingue claramente la diferencia de patrón.



La cuantificación del comienzo de la cópula confirma las dos pautas que diferencian a las dos especies, siendo *D. buzzatii* más rápida en la búsqueda de la hembra y consumando prácticamente todas las parejas. *D. koepferae*, en cambio, presenta un patrón lineal con el tiempo y muchas parejas se mantienen durante días juntas pero sin copular. Podemos contrastar

H₀: La primera cópula sigue una distribución normal

Podemos describir el comportamiento general aproximado mediante la siguiente tabla, aún teniendo en cuenta que los datos están sesgados debido a que la última clase de agrupación (>90) en realidad no corresponde a un tiempo real, aunque en el cálculo se toma con una duración igual a las otras clases.

	<u>Media(m)</u>	<u>N</u>	<u>Desviación típica</u>	<u>Z de Kolmogorov-Smirnov</u>
<i>D. Koepferae</i> San Luis(88)	58.9	33	41.37	0.928 ^{ns}
<i>D. Koepferae</i> San Luis(58)	48.22	31	34.87	2.032***
<i>D. Koepferae</i> San Luis (8)	56.4	14	38.40	1.014 ^{ns}
<i>D. koepferae</i> Palo Labrado	62.1	35	35.93	1.807**
<i>D. buzzatti</i> San Luis	29.4	43	26.93	1.724**
<i>D.buzzatti</i> _Carboneras	35.0	46	33.39	1.676**

*** = $P < 0,001$ ** = $P < 0,01$ * = $P < 0,05$ ns=no significativa

A la vista de la tabla, y con las reservas ya citadas, podemos concluir que las poblaciones de *D. buzzatti* se alejan de una distribución normal, mientras que las de la otra especie presentan heterogeneidad en su distribución

H_o: Las distintas especies presentan un comienzo medio de cópula asimilable

Comprobamos la condición de igualdad de varianzas mediante el test de Levene. El valor de probabilidad calculado es de 0,000, por lo que se rechaza la igualdad.

Escogemos por lo tanto un test de Krustal-Wallis para igualdad de medias, del que se obtiene un valor del estadístico de 23.209. La probabilidad asociada a este valor, con los grados de libertad correspondientes es de 0,000. Podemos rechazar por lo tanto la hipótesis nula, y por lo tanto, obtenemos diferencias entre las especies estudiadas.

Nos planteamos a continuación:

H_o: Las distintas poblaciones de cada especie presentan un comienzo medio de cópula asimilable

	<u>Levene</u>	<u>Valor P (Contraste T)</u>
Poblaciones de <i>D. buzzatii</i>	0.032*	0.387 ^{ns}
		<u>Valor P (Krustal-Wallis)</u>
Poblaciones de <i>D. koepferae</i>	0.073 ^{ns}	0.367 ^{ns}

*** = $P < 0,001$ ** = $P < 0,01$ * = $P < 0,05$ ns=no significativa

Pese a la igualdad de varianzas, se emplea el contraste Krustal-Wallis por falta de ajuste a la distribución normal de algunas poblaciones. De todas maneras, un análisis ANOVA devuelve igual resultado

A la vista de los valores de contraste, podemos aceptar la hipótesis nula, y concluir que las distintas poblaciones de cada especie tienen un tiempo medio de comienzo de cópula comparable.

Cruces masales

Los resultados de los diez cruces de 10 x 10 individuos de las poblaciones de *D. koepferae* fueron similares: en todos ellos los intentos de cópula comenzaron desde la puesta en contacto y durante toda la observación. Las primeras cópulas fueron registradas en cada tubo siempre en la primera clase de tiempo (antes de los diez minutos) a los 4, 5, 7, 8 y 9 minutos, con sólo una excepción a los 18 minutos. En todos los casos fueron observadas múltiples cópulas simultáneas.

Los cruces realizados en iguales condiciones de diez machos *D. buzzatii* con diez hembras *D. koepferae* tuvieron un comportamiento asociado a la especie: los machos *D. buzzatii* inmediatamente comienzan la secuencia de cortejo y acosan a las hembras, que rechazan constantemente sus intentos. No se ha observado ninguna cópula

Duración de la cópula

La duración de la cópula se calculó como período desde acoplamiento hasta la separación. Se contrasta:

H₀: La duración media de la cópula sigue una distribución normal

Para elegir el contraste más adecuado a esta hipótesis comprobamos en un primer acercamiento el ajuste a la distribución normal de los datos de cada población realizando una prueba de Kolmogorov-Smirnov respecto al total de datos de cada población

	<u>Media(s)</u>	<u>Nº parejas</u>	<u>Desviación típica</u>	<u>Valor P</u>
<i>D. Koepferae</i> San Luis (88)	187s	12	49.92	0.341 ^{ns}
<i>D. Koepferae</i> San Luis (58)	254s	22	59.76	0.970 ^{ns}
<i>D. Koepferae</i> San Luis (8)	130s	9	37,77	0,994 ^{ns}
<i>D. koepferae</i> Palo Labrado	135s	12	46,83	0,683 ^{ns}
<i>D. buzzatti</i> San Luis (6)	105s	27	21,44	0,214 ^{ns}
<i>D.buzzatti</i> _Carboneras	107s	32	20,20	0,610 ^{ns}

Podemos afirmar con un grado de significación del 0,5% que las cinco poblaciones se ajustan a una distribución normal.

H₀: La duración media de la cópula es igual entre las especies

Comprobamos la condición de igualdad de varianzas mediante el test de Levene. El valor de probabilidad calculado es de 0,000, por lo que se rechaza la igualdad.

Estos análisis preliminares nos llevan a escoger un test de Krustal-Wallis para igualdad de medias, que tras calcularlo da un valor P de 0,000. Podemos rechazar por lo tanto la hipótesis nula, y por lo tanto, obtenemos diferencias entre las poblaciones estudiadas.

Nos planteamos a continuación:

H₀: La duración media de la cópula es igual dentro de cada especies

Repetimos los contrastes con los siguientes resultados:

	<u>Levene</u>	<u>Valor P (contraste T)</u>
Poblaciones de <i>D. buzzatii</i>	0.732 <i>ns</i>	0.898 <i>ns</i>
		<u>Valor P (ANOVA)</u>
Poblaciones de <i>D. koepferae</i>	0.357 <i>ns</i>	0.000***

*** = P<0,001 ** = P<0,01 * = P<0,05 ns=no significativa

Podemos afirmar por lo tanto que las poblaciones de *D. buzzatii* tienen una duración media de cópula similar, mientras que apreciamos heterogeneidad en las poblaciones de *D. koepferae*.

Para intentar detectar cual es la fuente de heterogeneidad se realizó una prueba *post hoc* de Tukey. Esta análisis indica que es *D. Koepferae* San Luis (58) la línea discordante. De las otras tres poblaciones, San Luis (8) y Palo Labrado presentan una alta homogeneidad (valor P prueba de Tukey igual a 0.996) respecto a *D. Koepferae* San Luis (88) (valor P igual a 0.071). Interpretamos estos resultados por la posible pérdida de fertilidad de las cepas mantenidas en el laboratorio durante años frente a las cepas recolectadas recientemente de la naturaleza.

Resumen del apartado

1. Las dos especies objeto de este estudio presentan una mecánica copulatoria similar a la de cualquier díptero.
2. Ambas especies presentan diferencias significativas en parámetros asociados a la cópula, como son la ratio de parejas con descendencia, el momento de comienzo o la duración media de la cópula.
3. Las poblaciones de *D. buzzatii* se comportan de manera homogénea, mientras que las de *D. koepferae* son más heterogéneas en los parámetros citados anteriormente. Estas últimas parecen tener un comportamiento lineal, del más extremo *D. koepferae* San Luis(8)>> *D. koepferae* Palo Labrado >> *D. koepferae* 58 >> *D. koepferae* 88.
4. El comportamiento reproductivo de *D. koepferae* parece ser dependiente de la densidad de individuos.
5. El aislamiento reproductivo de las dos especies proviene del rechazo de las hembras *D. koepferae*.

OBTENCIÓN DE CRUZAMIENTOS HÍBRIDOS

El alto nivel de aislamiento precigótico mostrado entre las poblaciones de *Drosophila buzzatii* y *Drosophila koepferae* utilizadas en este estudio produjo una extrema dificultad en la obtención de cruzamientos. Durante varios años se empleó la producción diaria de las distintas poblaciones de cada especie, variando los criterios de unión con los parámetros expuestos en material y métodos hasta un total aproximado de cinco mil réplicas.

En dos pruebas independientes de 158 y 60 cruzamiento de diez por diez adultos se observaron larvas o pupas en 10 y 3 cruces respectivamente, lo que indicaría un número de cópulas efectivas de alrededor del 5% por vial. Sin embargo las cantidades observadas fueron mínimas, de 1-10 individuos, y sólo en un caso se observó descendencia adulta, lo que disminuiría el porcentaje a un 0.5% por vial.

El bajo número de descendientes, sumado a la dificultad de obtención de cruzamiento de estos individuos en los sucesivos retrocruces hace que la obtención de híbridos portando fragmentos de una especie en otra sea excepcional y el tratamiento estadístico sobre las condiciones que mejoren la efectividad resulta pobre.

De todos los cruces realizados sólo se ha podido realizar retrocruces efectivos en seis de las F1 obtenidas. La puesta en homocigosis de los fragmentos obtenidos y la obtención sobrevenida de los letales *pseudoequilibrados*, así como el resto de los análisis se realizaron a partir de estos cruzamientos

Selección de fragmentos

Teniendo en cuenta los criterios señalados en el capítulo de material y métodos y las posibilidades que la recombinación nos ofreció, se seleccionaron los siguientes fragmentos introgresados para su posterior puesta en homocigosis: (entre paréntesis la abreviatura distintiva que se utiliza en algunos momentos)

- a) 4 A1 (A1)
- b) 4 A4-B3 (I) (ab1)
- c) 4 A4-B3 (II): (ab2) fragmento similar al anterior, obtenido independiente, levemente más pequeño
- d) 4 B3-C2(bc)
- e) 4 C2-C3 (c)
- f) 4 D1-D5 (d)¹

¹ La primera línea 4 d1-d5 en homocigosis fue proporcionado por el Dr. Antonio Carvajal a partir de su tesis doctoral, de la que este estudio parte como inicio y referencia. Posteriormente la línea que contenía este fragmento fue decayendo hasta desaparecer y fue sustituida por otra conseguida a partir del protocolo descrito anteriormente. Todas los estudios realizados en este trabajo se realizaron con está última cepa.

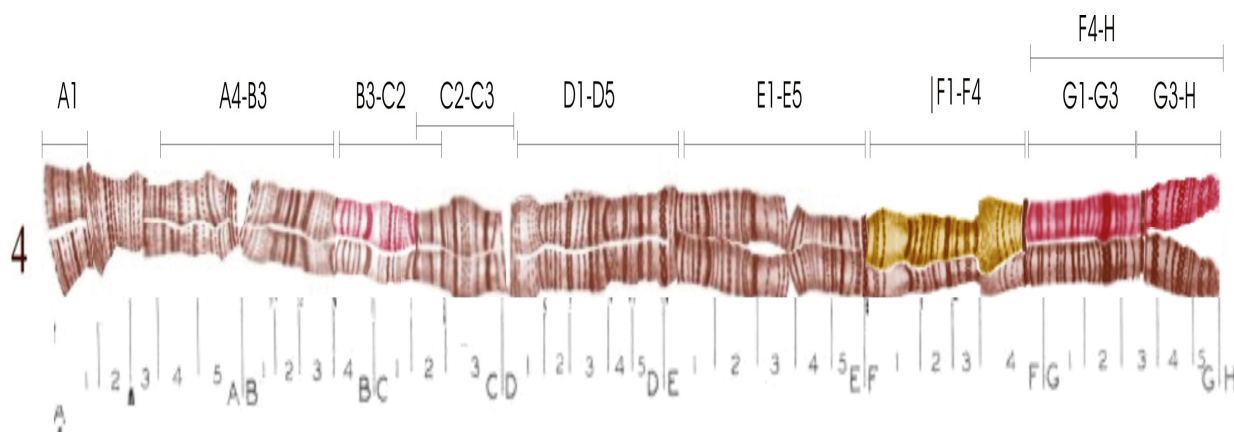
- g) 4 E1-E5(w) (e)
- h) 4 F1-F4
- i) 4 F4-H
- j) 4 G1-G3
- k) 4 G3-G5 (o 4 G3-H, a veces encontramos el extremo abierto)

Obtención de líneas

La figura representa un montaje del cromosoma 4 de cualquiera de las dos especies de *Drosophila* de este trabajo. Se señalan en asinapsis todos los fragmentos situados unos a continuación de otros para facilitar la comprensión, los distintos tonos señalan las distintas condiciones en los que se han podido colocar

- Tono pardo: fragmentos que se han colocado en homocigosis
- Tono rojizo: letales *psedoequilibrado*
- Tono amarillo: segmentos 4 F1-F4 no seleccionado por cuestiones técnicas
- Tono pardo sin asinapsis: 4 A2-A3 sección de la que no se han logrado obtener muestras

Esta última condición se cuantificó en un porcentaje menor al 5% de cromosoma total, y sobre ella no se han podido realizar ningún experimento., al igual que con 4F1-F4

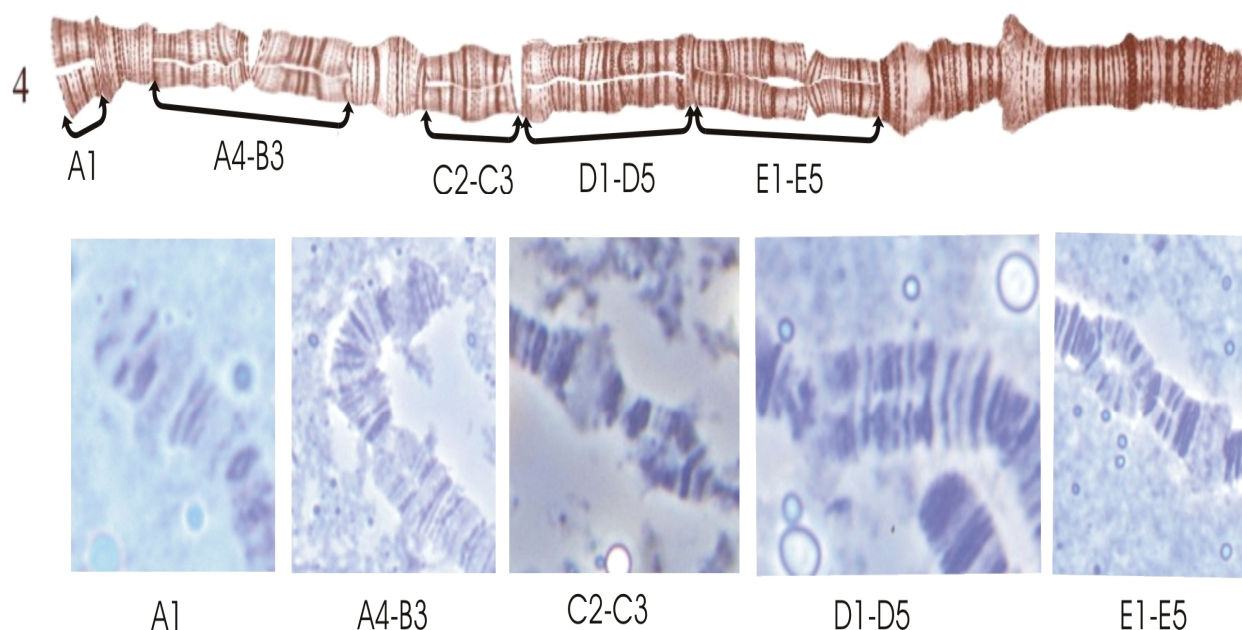


Diseños cromosómico modificado a partir de González, 2008

Homocigotos

Se han conseguido establecer líneas con los segmentos 4 A1; 4 A4-B3; 4 C2-C3; 4 D1-D5 y 4 E1-E5(w) de *Drosophila koepferae* en homocigosis. Esto constituye la sustitución efectiva de esas porciones de cromosoma de *Drosophila buzzatii* por su correspondiente de *Drosophila koepferae*. En las cepas así obtenidas y aunque la recombinación no se evita, se realiza siempre dentro de los segmentos correspondientes a cada especie. Por ello se mantiene en cruzamientos masales sin que se afecte su arquitectura genética específica.

Una observación cromosómica de la zona reemplazada en las líneas homocigotas no presentaría ninguna diferencia observable sobre la correspondiente de *D. buzzatii* o *D. koepferae*. Es por eso que el gráfico muestra fotos que han sido tomadas tras el retrocruce que sirve de comprobación para poder observar la posición de los fragmentos totalmente sustituidos y que presentan desapareamiento entre los dos homólogos



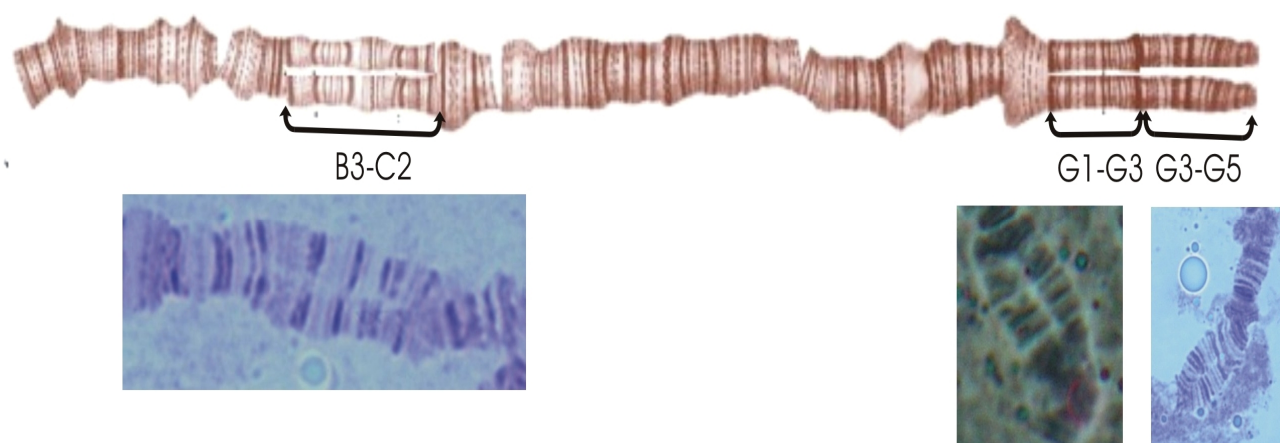
Letales "pseudoequilibrados"

Los fragmentos 4 B3-C2, 4 G1-G3 y 4 G3-G5 se han logrado poner en homocigosis exclusivamente en larvas y no se han podido mantener en forma de cruce masal genéticamente uniforme para esos segmentos, por posible esterilidad o inviabilidad en los adultos que llevaban la configuración en homocigosis.

Para estabilizar en estos fragmentos se han diseñado una arquitectura genética paralela a la de que serían los letales equilibrados. Se asocian en uno de los homólogos la inversión 4s letal que sugirió y aislamos durante nuestros experimentos con el fragmento de *D. koepferae* en el otro

Al cruzar estos individuos entre si [segmento *D. koepferae* + ordenación estándar / segmento *D. buzzatii* + letal 4s] podemos observar la misma arquitectura genética en la descendencia, ya que las ordenaciones 4s/s son letales y las de *D koepferae*/ *D koepferae* o son letales o el adulto resultante estéril.

El propio mantenimiento de estas líneas en las condiciones descritas anteriormente representa una prueba más de la imposibilidad de colocar en homocigosis dichas secciones, pues de lo contrario aparecerían en la descendencia adulta. Decidimos llamar letales *psedoequilibrado* a estas líneas porque al analizar cromosomas politénicos de larvas sí vimos homocigotos, ausentes(o estériles) luego en los adultos y porque la estabilidad de estas cepas no es completa al intervenir la recombinación reduciendo y eliminando el fragmento de *D. koepferae*



Con el fragmento 4 F4-H, el último en obtenerse, no ha sido posible establecer ni una línea de letales equilibrados ni una homocigota.

El segmento 4F1-F4 fue seleccionado tras una primera F_1 en la que aparecía, pero no se pudo conservar el suficiente tiempo como para experimentar con él el protocolo de puesta en homocigosis. Nuevamente se repitió la misma situación en una segunda F_1 . En una tercera tentativa y un análisis más pormenorizado se reparó en la disección y observación de cromosomas politénicos que en una misma preparación de la misma larva este fragmento aparecía a veces en asinapsis, a veces sin ella y en los restantes en una situación intermedia de difícil determinación. Debido a que la base de este trabajo es la diagnosis de segmentos revelados por asinápsis se decidió no analizar esta sección.

ESTUDIO DE LA FERTILIDAD

Formación de esperma

Nuestro estudio de la fertilidad se basa en la detección del momento en el que se comienza a desarrollar esperma móvil considerando fértil al macho que sí lo presenta. Partiendo de esta premisa con los datos experimentales contrastamos las siguientes hipótesis:

Especies de referencia

H_0 : ambas especies forman su esperma simultáneamente

Para contrastar la afirmación hemos aplicado un test de homogeneidad ² sobre el conjunto de los valores obtenidos en las especies origen de este estudio, ordenados por clase

	testículos sin esperma de 50 analizados por edad					<u>%crom. Introgres.</u>	<u>horas en alcanzar 50% testículos con esperma</u>
	<u>24 horas</u>	<u>48 horas</u>	<u>72 horas</u>	<u>96 horas</u>	<u>120 horas</u>		
<i>D. buzzatii</i> SL 6	42	7	1	1		0	36
<i>D. koepferae</i> SL 8	50	47	42	27	5	0	99

El cálculo nos da un valor P de $1,5 \times 10^{-19}$ altamente significativo, que nos lleva a rechazar la homogeneidad de comportamiento entre *D. koepferae* y *D. buzzatii*. Por lo tanto existe una diferencia en el desarrollo testicular de las especies origen de este estudio. Los machos de *D. koepferae* forman su esperma y llenan sus vesículas seminales más tarde que sus correspondientes en *D. buzzatii*. Por tanto se rechaza la hipótesis

Homocigotos

H_0 : los híbridos homocigotos se comportan como *D. buzzatii*

En este caso hemos establecido análisis diferentes de los individuos con fragmentos en homocigosis y en heterocigosis porque consideramos que su distinta arquitectura cromosómica hace que no puedan considerarse una misma población estadísticamente hablando.

Exponemos los datos generales en tablas similares a la anterior y que sirven de base para los siguientes contrastes. En la primera se representa el porcentaje de machos sin esperma entre 24 y 96 horas

junto con el tanto por cien de material genético introgresado de las líneas homocigotas. También se muestra el parámetro² creado para estimar las horas en las que el 50% de los machos producen esperma.

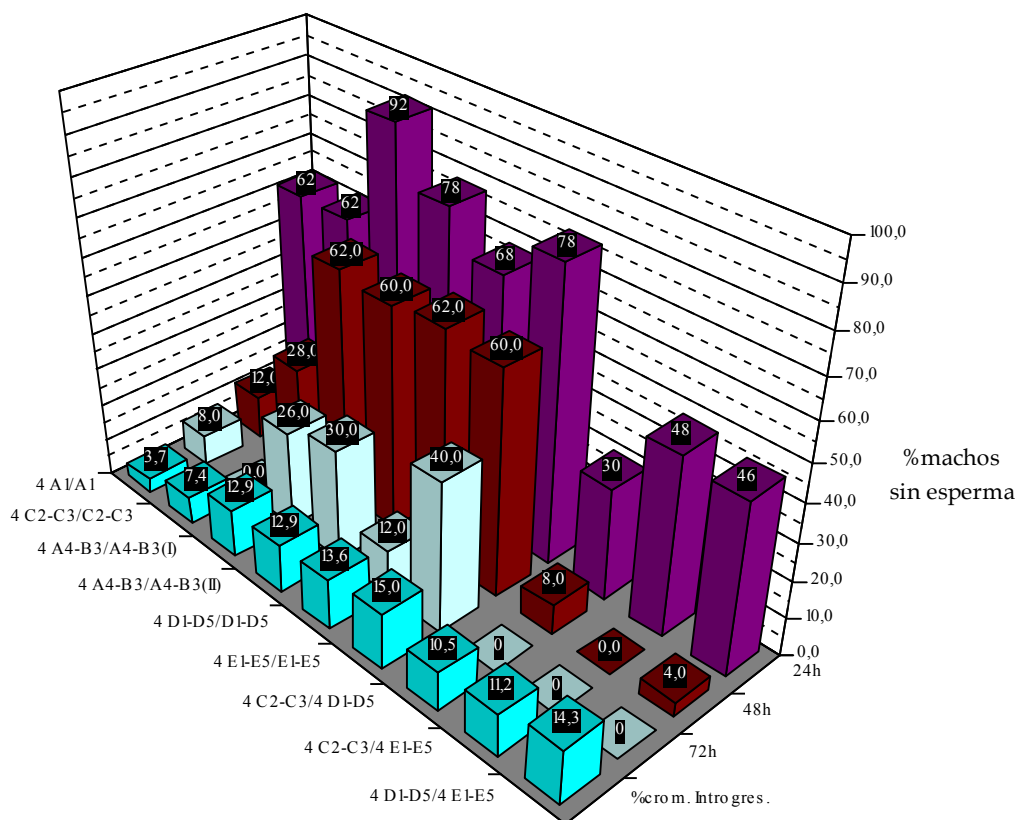
		Homocigotos testículos sin esperma de 50 analizados por edad				<u>%crom. Introgres.</u>	<u>horas en alcanzar 50% testículos con esperma</u>
		<u>24 horas</u>	<u>48 horas</u>	<u>72 horas</u>	<u>96 horas</u>		
A1	A1	31	6	4	0	3,7	30
A4-B3(I)	A4-B3(I)	46	31	13	0	12,9	58
A4-B3(II)	A4-B3(II)	39	30	15	4	12,9	56
C2-C3	C2-C3	31	14	0	0	7,4	29
D1-D5	D1-D5	34	31	6	7	13,6	54
E1-E5(w)	E1-E5(w)	39	30	20	18	15,0	60

La tabla siguiente muestra los datos de una aproximación al comportamiento de los cruces entre las líneas homocigotas entre si. Su finalidad fundamental es la construcción de un gráfico que permita avanzar tendencias convergentes o divergentes.

		Dobles heterocigotos trans testículos sin esperma de 50 analizados por edad				<u>%crom. Introgres.</u>
		<u>24 horas</u>	<u>48 horas</u>	<u>72 horas</u>	<u>96 horas</u>	
C2-C3	D1-D5	15	4	0	0	10,5
C2-C3	E1-E5(w)	24	0	0	0	11,2
D1-D5	E1-E5(w)	23	2	0	2	14,3

El diagrama a continuación se construyó con estos datos y relaciona el porcentaje de material introgresado en homocigosis y similar en heterocigosis y el tiempo en horas que permanecen los machos sin esperma. También se muestra la localización en el intervalo citológico de los fragmentos testados

² Ver material y métodos página 86



Se observa que las líneas homocigotas presentan un retraso evidente en el período de formación de esperma respecto a las correspondientes heterocigotas

Los datos de la tabla siguiente reflejan el análisis estadístico mediante prueba de homogeneidad χ^2 de cada línea en su conjunto, ordenada por clases de edad y porcentaje de machos sin esperma móvil respecto a su cepa salvaje de *D. buzzatii*: (los fragmentos se ordenan de mayor a menor material introgresado)

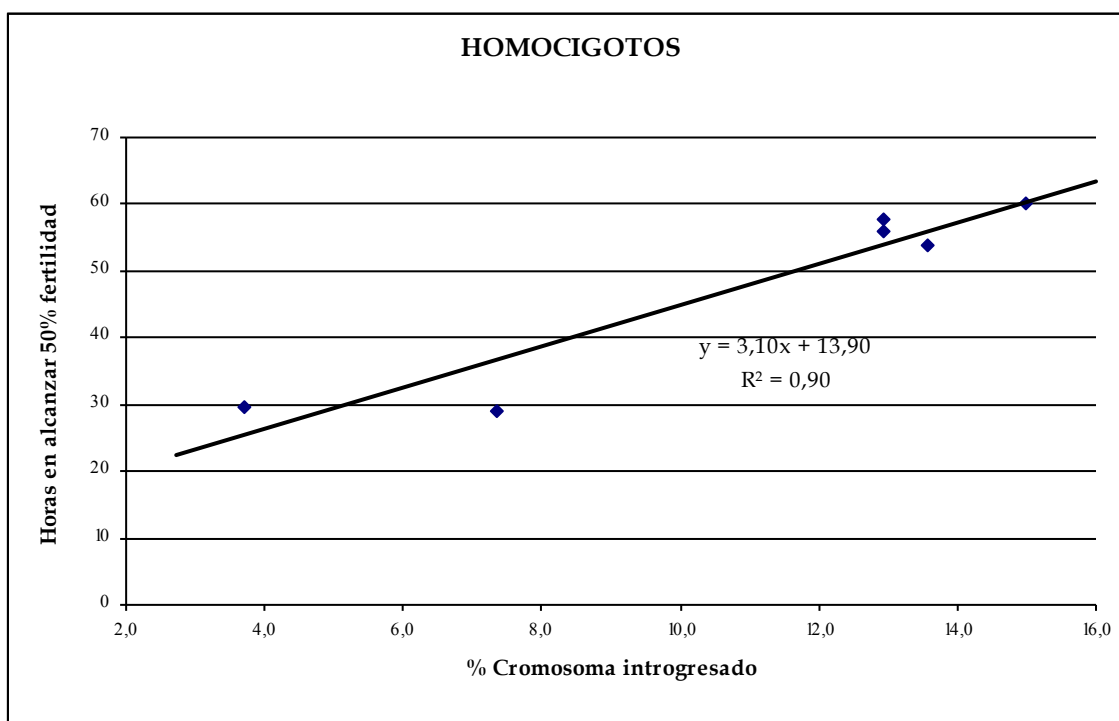
línea homocigota	Valor χ^2	P
A1	2,67	0,26309
C2-C3	4,74	0,0934
A4-B3(I)	15,46	0,00043
A4-B3(II)	19,27	0,00006
D1-D5	16,42	0,00027
E1-E5(w)	22,42	0,00001

Se rechaza la hipótesis con un nivel de significación de $\alpha = 0,05$ de comportamiento homogéneo respecto a la especie donadora del fondo genético excepto en los fragmentos 4A1 y 4C2-C3, en la que el valor del estadístico se queda en la zona de aceptación, si bien con un valor relativamente cercano a la zona de rechazo en este último. La progresividad en las diferencias estadísticas a medida que aumentaba el material introgresado hace sospechar una posible correlación

H₀: el retraso en la formación de esperma móvil se relaciona con la cantidad de material introgresado en homocigosis

Para contrastar la relación entre material introgresado y retraso en la formación de esperma se diseñó un parámetro³ cuyo valor se puede ver en las tablas anteriores y que nos aproxima al tiempo en que la mitad de los machos ya desarrollan esperma móvil

Una representación gráfica se puede ver en el diagrama de dispersión siguiente, donde se aprecia el incremento de los tiempos en alcanzar el 50% de machos con esperma frente a la cantidad de material introgresado



Se calculó un valor de correlación lineal de $r = 0.95$, significativo con un nivel de significación de 0'01 ($r(4, 0.01) = 0.917$). Como este coeficiente toma valores de $+1/-1$ para máxima correlación y 0 para independencia podemos concluir que el retraso en la formación de esperma móvil es en la práctica directamente proporcional a la cantidad de material genético ajeno en homocigosis. La parte de la varianza que se explica por este factor es del 90%

³ Ver material y métodos para los detalles del cálculo (página 134)

La correlación es tan alta que podemos incluso predecir la influencia teórica que tendría una cantidad de material introgresado en homocigosis sobre el retraso del desarrollo testicular. Seguiría una recta de ecuación:

$$y = 2.98x + 14.26$$

Según nuestros datos deberíamos esperar que cada punto porcentual de material introgresado en homocigosis produjera un retraso de aproximadamente tres horas en el comienzo de formación del esperma

Dobles heterocigotos trans

La tabla anterior de heterocigotos marcaba diferencias de comportamiento con los homocigotos. Para completar datos se elaboró otra que refleja un análisis testicular de todos los posibles cruzamientos entre las líneas homocigotas conseguidas.

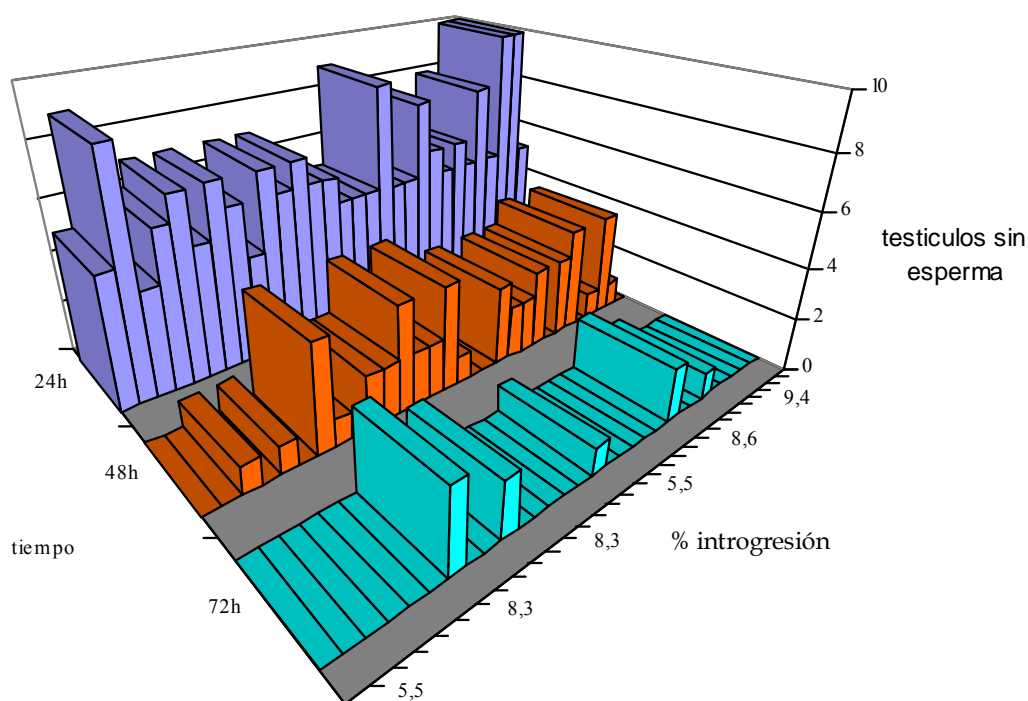
Dobles heterocigotos trans

(10 testículos analizados por edad hasta 72 horas)

		testículos sin esperma			%crom. Introgres.	<u>horas en alcanzar 50% testículos con esperma</u>
		<u>24 horas</u>	<u>48 horas</u>	<u>72 horas</u>		
A1	A4-B3 (I)	5	0	0	8,3	24
A1	A4-B3 (II)	9	0	0	8,3	35
A1	C2-C3	4	1	0	5,5	16
A1	D1-D5	6	0	0	8,6	28
A1	E1-E5(w)	7	1	0	9,4	32
A4-B3 (I)	A1	5	0	0	8,3	24
A4-B3 (I)	C2-C3	7	4	3	12,9	28,8
A4-B3 (I)	D1-D5	6	1	0	13,2	18
A4-B3 (I)	E1-E5(w)	4	0	0	14,0	33,6
A4-B3 (II)	A1	7	2	2	8,3	30
A4-B3 (II)	C2-C3	6	2	0	12,9	30
A4-B3 (II)	D1-D5	7	4	0	13,2	30
A4-B3 (II)	E1-E5(w)	6	2	0	14,0	24
C2-C3	A1	6	2	0	5,5	24
C2-C3	A4-B3 (I)	5	4	0	10,1	24
C2-C3	A4-B3 (II)	5	1	1	10,1	35
C2-C3	D1-D5	5	0	0	10,5	24
C2-C3	E1-E5(w)	9	0	0	11,2	24
D1-D5	A1	5	3	0	8,6	36
D1-D5	A4-B3 (I)	5	2	0	13,2	32

D1-D5	A4-B3 (II)	8	2	0	13,2	24
D1-D5	C2-C3	6	3	2	10,5	32
D1-D5	E1-E5(w)	5	0	0	14,3	24
E1-E5(w)	A1	6	3	0	9,4	33
E1-E5(w)	A4-B3 (I)	5	4	1	14,0	24
E1-E5(w)	A4-B3 (II)	8	0	0	14,0	44
E1-E5(w)	C2-C3	5	1	0	11,2	37
E1-E5(w)	D1-D5	10	4	0	14,3	24

Con estos datos se ha confeccionado un diagrama de barras similar al anterior, que permite hacer la comparación más visual. La cantidad de datos desaconseja representar todos los datos de homocigotos y heterocigotos en una sola gráfica.



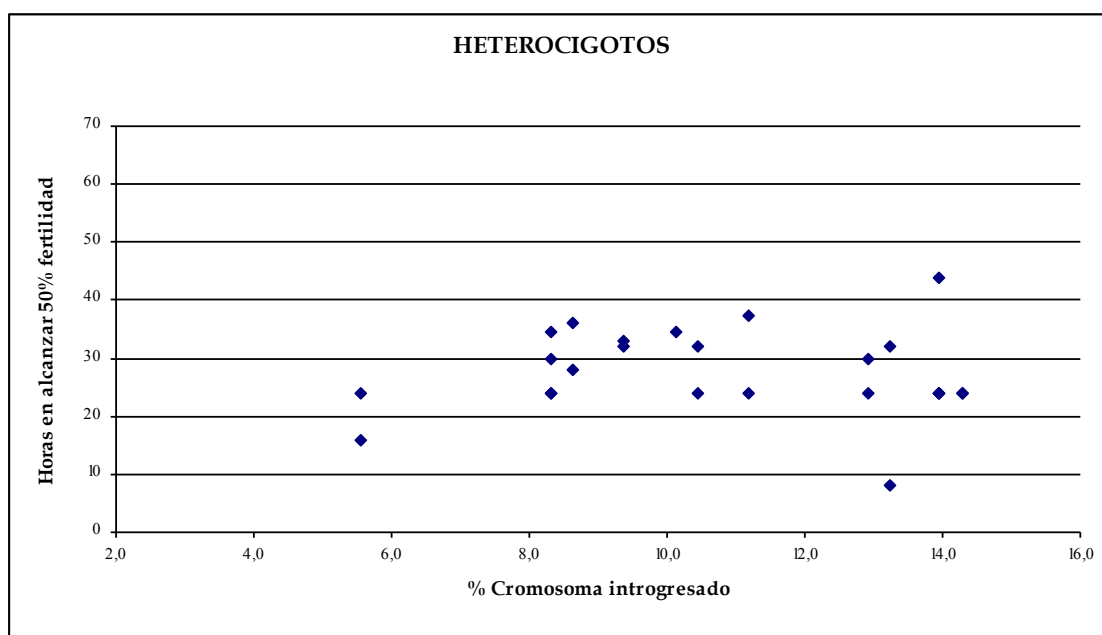
Con el diseño experimental propuesto la gráfica señala la diferencia entre el comportamiento de estos machos y las líneas homocigotas. Podemos considerar que a las 48 horas una gran mayoría de machos son capaces de fecundar, y a las 72 la práctica totalidad. La presencia de pequeños porcentajes de machos

todavía estériles a las 72 horas es realmente un efecto de la muestra: al analizar en estos cruces sólo 10 testículos por edad, un solo macho sin esperma hace resaltar esa línea, aunque analizado el conjunto de líneas esa circunstancia pierde relevancia.

Se contrastan:

H₀: el retraso en la formación de esperma móvil se relaciona con la cantidad de material introgresado en heterocigosis

El diagrama de dispersión no presenta un patrón claro de la nube de valores y la relativa independencia del coeficiente de correlación en el material en heterocigosis indicaría o bien un nivel de resolución temporal amplio o bien una no dependencia real.



Con la mismas premisas anteriormente citadas, el coeficiente de correlación calculado es $r = 0.19$, no significativo al 5% al ser menor que $r(18, 0.05) = 0.444$, devuelto por las tablas para el conjunto de los heterocigotos

H₀: los cruzamientos dobles heterocigotos trans son homogéneamente recíprocos

Se agrupan los datos por parejas de cruzamientos recíprocos macho a x hembra b / macho b x hembra a y se contrasta su homogeneidad. Dado que el número de testículos esperados es muy bajo, se realiza un test exacto de Fisher o test chi cuadrado de homogeneidad con corrección de Yates. En todos los casos ofrece un valor que entra dentro de aceptación para un nivel de significación del 5%, por lo que podemos afirmar que los cruces recíprocos son homogéneos entre si

H₀: los cruzamientos dobles heterocigotos trans son homogéneos entre sí

Para contrastarlo se realiza una chi-cuadrado de homogeneidad con el conjunto de los datos, agrupados por tipo de cruzamiento y aplicando la corrección de Yates a los valores esperados menores que 5. Con un nivel de significación del 5% el estadístico se queda muy lejos de la zona de rechazo, por lo que podemos afirmar que todos los cruces se comportan homogéneamente.

H₀: el conjunto de los híbridos dobles heterocigotos trans se comportan como D. buzzatii

Se analiza el comportamiento conjunto de todos los cruzamientos mediante una chi-cuadrado de homogeneidad. Con un nivel de significación del 5% aceptamos esta hipótesis, y concluir que los dobles heterocigotos trans se comportan como la especie de referencia.

H₀: cada tipo de doble heterocigoto trans se comporta como D. buzzatii

Por otro lado se analizaron cada cruzamiento uno a uno respecto a su cepa especie de referencia *D. buzzatii*, aplicando la corrección de Yates cuando se requiere. En todas ellas para los datos obtenidos se acepta la hipótesis de homogeneidad, con la excepción del par de cruces 4A4-B3(I) con su homóloga 4A4-B3(II). Esto más que un problema es una confirmación de los datos anteriores pues estos fragmentos abarcan el mismo intervalo cromosómico y pertenecerían realmente a la categoría de homocigotos

De todas maneras y aunque no significativo estadísticamente, se observa una acercamiento de los valores de probabilidad a la zona de rechazo a medida que los cruzamientos abarcan una mayor cantidad de introgresión.

Para resolver el problema surgido exponemos el contraste de una nueva hipótesis basándose en los resultados de un experimento similar pero tomando tiempos más cortos de entre 24 y 33 horas. En la tabla siguiente, el % crom se refiere a la cantidad en tanto por cien de cromosoma de *Drosophila koepferae* introgresado en doble heterocigosis. En cada encuadre y columna se encuentran los datos, el porcentaje respecto al total, y en verde el valor para esa celda del estadístico de la χ^2 .

24 a 30 horas de desarrollo

macho	hembra	% crom	sin esperma			esperma móvil			
A4-B3 (II)	E1-E5(w)	13,95	22	75,9%	(0,339)	7	24,1%	(0,688)	29
E1-E5(w)	A4-B3 (II)	13,95	16	72,7%	(0,107)	6	27,3%	(0,218)	22
A1	C2-C3	5,55	25	62,5%	(0,122)	15	37,5%	(0,247)	40
C2-C3	A1	5,55	35	70,0%	(0,066)	15	30,0%	(0,135)	50
<i>D. buzzatii</i>		0	30	60,0%	(0,367)	20	40,0%	(0,746)	50
			128			63			191
χ^2 3,04		P=0,114							

30 a 33 horas de desarrollo									
macho	hembra	% crom	sin esperma			esperma móvil			
A4-B3 (II)	E1-E5(w)	13,95	9	75,0%	(3,334)	3	25,0%	(2,334)	12
E1-E5(w)	A4-B3 (II)	13,95	17	58,6%	(2,143)	12	41,4%	(1,500)	29
A1	C2-C3	5,55	14	26,9%	(2,566)	38	73,1%	(1,796)	52
C2-C3	A1	5,55	16	36,4%	(0,248)	28	63,6%	(0,173)	44
<i>D. buzzatii</i>		0	21	42,0%	(0,008)	29	58,0%	(0,006)	50
			77			110			187
χ^2	14,11	P=0,007							

Fijando un $\alpha = 0,05$ y con el valor $P=0,114$ podemos aceptar H_0 y concluir que entre las 24 y 30 horas los cruzamientos se comportan uniformemente. Sin embargo, para ese mismo nivel de significación debemos rechazar H_0 entre 30 y 33 horas por su valor $P=0,007$, notablemente bajo. Utilizando las desviaciones por celda del estadístico (en verde) podemos comentar es que el valor $P=0,114$ de 24-30 horas, aunque no significativo, es cercano a la zona de rechazo. Si incluimos la desviación por celda, observamos que la mayor aportación la realiza la cepa salvaje y la de mayor tamaño introgresado, los dos extremos en los que el tanto por cierto de fertilidad es mayor y menor respectivamente en ese tiempo. Podemos especular sobre razonables retrasos en las cepas con material ajeno aunque pequeñas y poco significativas a esa edad.

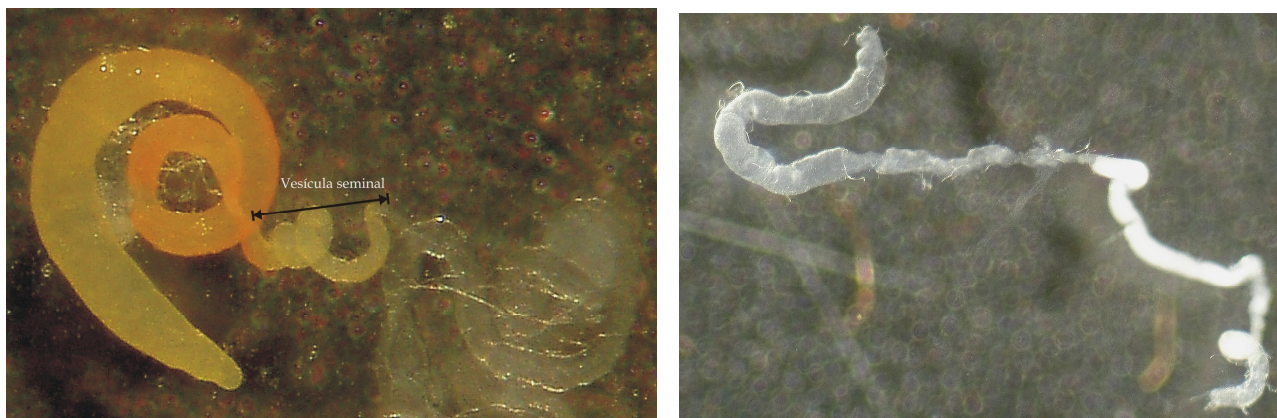
La situación cambia a las 30-33 horas, donde sí existen diferencias significativas con una $P=0,007$. Realizando un mismo estilo de comentario, vemos que en este caso el mayor aporte de diferencias se debe a los cruces con mayor cantidad cromosomita introgresada de *D. koepferae.*, bajando progresivamente según disminuye la carga genética extraña.

Sin olvidar que los dos grupos analizados podrían ser heterogéneos por la posibilidad de incluir edades dentro de un intervalo, podemos concluir que existe un retraso en el desarrollo de esperma móvil en los individuos con material diferente. No podemos asegurarlo entre las 24 y 30 horas, pero sí confirmar su existencia a partir de las 30 horas.

Este resultado se refiere a un proceso que tiene el mismo comienzo (esterilidad) y final (fertilidad total) en todos los cruces analizados y que se desarrolla en unas pocas horas, probablemente entre 24 y 48 horas, y es aproximadamente a las 30 horas en donde se pone de manifiesto un efecto desigual, que además parece depender de la cantidad de material extraño existente.

Atrofia testicular

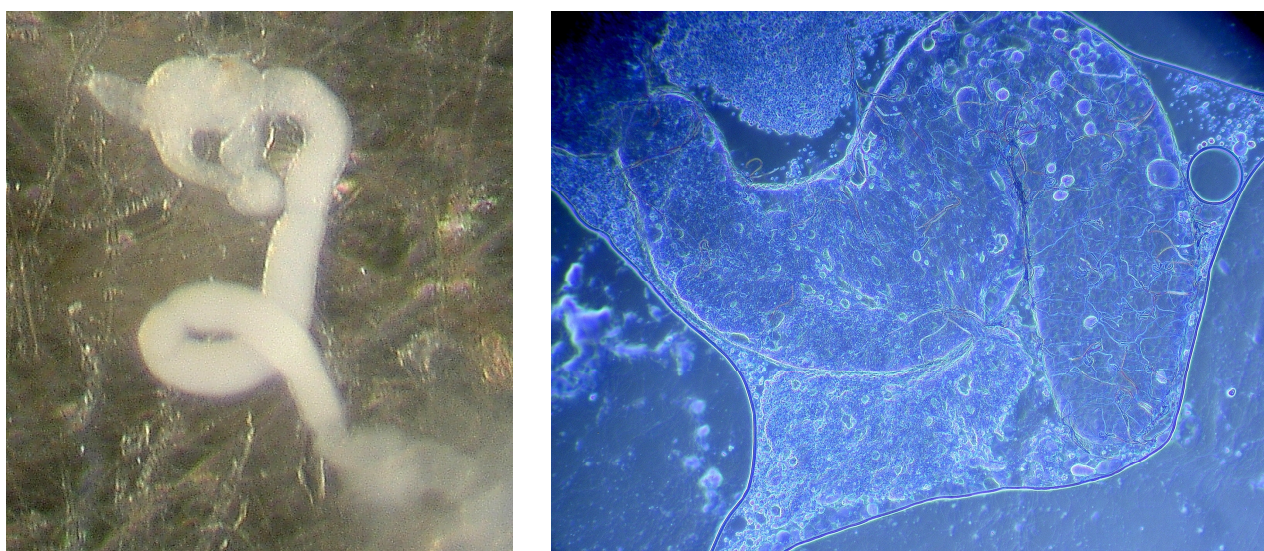
Al realizar los análisis testiculares en la cepa homocigota 4 E1-E5(w) apareció un fenotipo especial que denominamos descriptivamente “testículos atrofiados”.



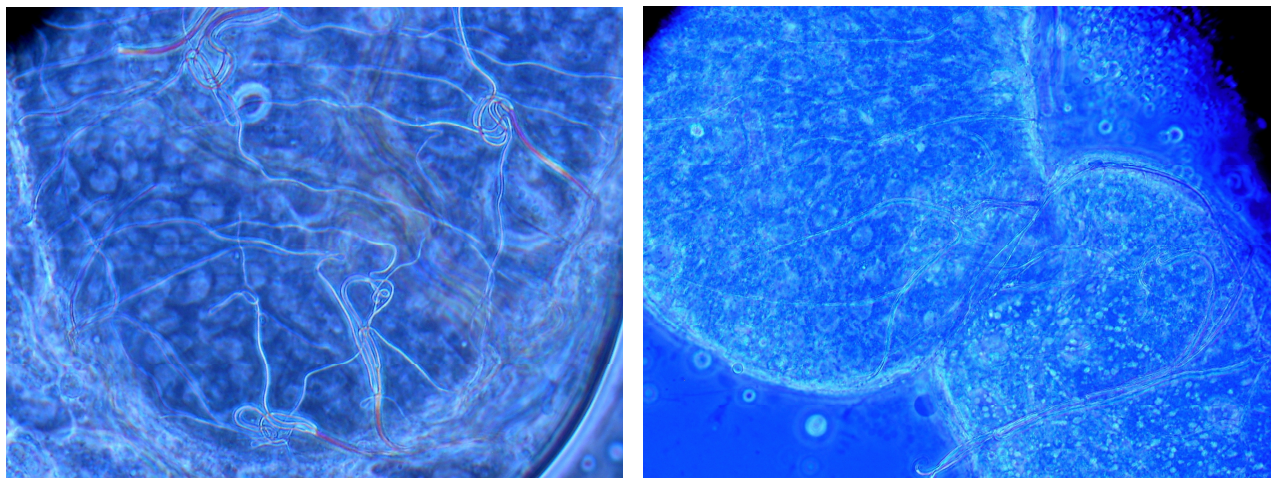
Comparación entre testículo normal (izquierda) y atrofiado (derecha). Obsérvese la diferencia de tamaño relativa a la glándula

Los machos que expresaban este fenotipo no llegan nunca a desarrollar esperma móvil, por lo que son totalmente estériles.

El aspecto de los testículos es anormalmente pequeño, de muy dificultosa disección y análisis, con la vesícula seminal totalmente vacía. La alteración de la línea germinal es total, como se aprecia en la serie fotográfica.



Testículos atrofiados a la lupa (x40) y al microscopio (x40). Se observan un tamaño reducido, una forma anormal y un contenido indefinido no asimilable con una espermatogénesis normal



Zona proximal (izquierda) y proximal, en su contacto con la vesícula seminal (derecha) (x200). Se observa más claramente la ausencia de un desarrollo normal del espermatozoide

Dudamos si incluir este apartado en este lugar o en el capítulo de alteraciones del desarrollo, pero aparece expuesta aquí por dos razones:

- a) Es una alteración que afecta evidentemente a la fertilidad de los machos
- b) Su proporción es alta, con incidencia definida e independiente de las variaciones ambientales

La proporción en la que aparecen se muestra en la siguiente tabla.

	series de análisis					
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Testículos atrofiados	14	14	14	18	12	10
Total testículos analizados	50	50	50	50	40	32
	28,0%	28,0%	28,0%	36,0%	30,0%	31,3%

Las series 1,2,3 y 4 corresponden a grupos de edad de 24, 48, 72 y 96 horas tras el nacimiento; la 5 y la 6 a machos tomados al azar de la población general de esa línea, por lo tanto de edades variadas

Se contrasta la hipótesis:

H₀: las distintas series tienen igual proporción de testículos atrofiados

Se realizó una prueba ² de homogeneidad con estos datos para contrastar la hipótesis. El test de homogeneidad da un valor P igual a 0,95 por lo que con un nivel de significación = 0'05 aceptamos la hipótesis

Si promediamos el conjunto de las series podemos afirmar que la proporción en la que aparece está característica es del 30'15% de los machos

Dado que las series son de varias edades y de distintas condiciones ambientales podemos proponer que el factor desencadenante es mayormente génico, sobre todo considerando los datos expuestos anteriormente que indican un retraso en el desarrollo testicular dependiente de la cantidad de ADN en

homocigosis de la especie donadora y que el fragmento 4E1-E4 es de los mayores que conseguimos colocar en homocigosis.

Resumen de resultados del apartado

Las dos especies objeto de este estudio tienen un diferente tiempo de desarrollo en sus testículos

- a) La arquitectura cromosómica de los individuos influye en su desarrollo testicular. Su influencia en forma de retraso en alcanzar esperma móvil es pequeña en los dobles heterocigotos trans pero significativamente mayor en los homocigotos
- b) La magnitud del efecto está directamente correlacionada con la cantidad de cromosoma extraño presente
- c) El mayor fragmento obtenido provoca una atrofia testicular en el 30% de los individuos machos. Aunque está asociado a una localización concreta, no se puede descartar que este fenotipo fuera el límite en la cantidad de material genético soportable y que un incremento provocaría tal proporción de individuos estériles en la población que la harían decaer y desaparecer

ESTUDIO DE LA RATIO SEXUAL

El desequilibrio sexual en híbridos de estas especies se centra en fundamentalmente en cuatro capítulos:

- Determinar si existen desviaciones en la proporción de algún sexo durante el desarrollo del individuo
- Determinar el momento en que se produce
- Cuantificar dicha inviabilidad
- Intentar identificar un patrón común de fondo

Diferencias de ratio sexual

Cruzamientos control:

En la siguiente tabla se muestran los valores de las poblaciones iniciales que se utilizaron en este estudio, y que constituyen alguna parte del genoma de los híbridos.

Líneas control			
	<u>macho</u>	<u>hembra</u>	<u>g</u>
			<u>Homogeneidad Bonf.</u>
<i>D. koepferae</i> San Luis (8)	280	314	ns
<i>D. buzzatii</i> San Luis (6)	252	264	ns
<i>D. buzzatii</i> San Luis 101 white	202	211	ns
<i>D. buzzatii</i> San Luis 4s/s	254	251	ns
♂ <i>D. buzzatii</i> SL6 x ♀ <i>D. buzzatii</i> SL101 w	65	119	0,35***
♂ <i>D. buzzatii</i> SL101 w x ♀ <i>D. buzzatii</i> SL6	201	233	ns

*** = $P < 0,001$ ** = $P < 0,01$ * = $P < 0,05$ (significación estándar) / ns=no significativo s=significativo (Bonferroni)

$g = n^{\circ}$ machos / total descendencia

Se analiza la hipótesis:

H₀= las muestras provienen de poblaciones con una proporción de machos y hembras igual al 50%

Para contrastarlo se realiza una χ^2 con un valor esperado de machos y hembras de la mitad del total. Se aplica una corrección de Bonferroni secuencial (Rice, 1988) tomando $\alpha=5\%$. Se acepta la H_0 si $P > \alpha/k$

A la vista de los datos y de los valores P aceptamos la H_0 en todos los casos y podemos afirmar que no hay diferencias con un nivel de significación de al menos un 5% entre el número de machos y hembras en ninguna de las poblaciones control, lo que prueba que machos y hembras se encuentran en la misma proporción.

Sin embargo en los cruces entre las cepas que, aún proviniendo de la misma población, derivan de isolíneas distintas, se observa una caída significativa del número de machos si las hembras son *D. buzzatii* San Luis 101 white, pero no en el cruzamiento recíproco, que da unos resultados significativamente diferentes (Chi cuadrado de homogeneidad con valor $P=0,011$)

Cruzamientos en homocigosis:

En paralelo a la anterior se muestran los datos de líneas con introgresiones en homocigosis. Los resultados de adultos corresponden a la suma de dos series que se han mantenido aisladas durante años: las obtenidas en el interior de una cámara de cría, con las condiciones más estables posibles, y las halladas de líneas en el exterior, con condiciones cambiantes y temperaturas medidas entre 18 y 25°C. Los datos de larvas corresponden a un único experimento realizado en la cámara de cría

Los datos de adultos se han agrupado tras calcular un test de homogeneidad χ^2 y comprobar que se comportan de manera homogénea con un nivel de significación del 5%, y tras aplicar el test secuencial de Bonferroni (Rice 1988). Se indica también el valor de g (proporción de machos respecto al total) en larvas y adultos

	Líneas homocigotas						
	Larvas			Adultos			
	<u>macho</u>	<u>hembra</u>	<u>g</u>	<u>macho</u>	<u>hembra</u>	<u>g</u>	<u>Valor P</u> <u>Homogen.</u>
A1	59	96	0,38**/s	271	285	0,49 ^{ns} / ^{ns}	0,0184*/ ^{ns}
ab1	62	88	0,41*/ ^{ns}	489	766	0,39***/s	0,5743 ^{ns} / ^{ns}
ab2	73	77	0,49 ^{ns} / ^{ns}	458	482	0,49 ^{ns} / ^{ns}	0,9897 ^{ns} / ^{ns}
C2-C3	63	95	0,40**/s	555	514	0,52 ^{ns} / ^{ns}	0,0047**/s
D1-D5	85	49	0,63**/s	567	326	0,63***/s	0,9891 ^{ns} / ^{ns}
E1-E5(w)	59	91	0,39**/s	281	432	0,39***/s	0,9859 ^{ns} / ^{ns}
*** = P<0,001 ** = P<0,01 * = P<0,05 (significación estandar) / ns=no significativo s=significativo (Bonferroni)							
g = nº machos / total descendencia							

Se plantean tres hipótesis:

H₀= las muestras provienen de poblaciones con una proporción de machos y hembras igual al 50%

Se contrasta la H₀ en larvas y adultos. Se concluye que todos los fragmentos producen desequilibrios significativos en la ratio sexual de larvas excepto 4A4-B3(II) (marginal en 4A4-B3(I)). En adultos se desvían del 50% 4D1-D5, 4E1-E5(w) y en 4A4-B3(I).

Hay que señalar, sin embargo, que en dos de las tres líneas en las que larvas y adultos parecen comportarse de manera distinta, el test de homogeneidad anterior las considera muestras de la misma población. De hecho, en 4A4-B3 (I), si se agrupan valores de larvas y adultos (el test de homogeneidad lo permitiría) se produce una diferencia entre machos y hembras altamente significativa.

El sentido de la desviación es siempre hacia menor cantidad de machos, excepto en el fragmento 4D1-D5. Esto explicaría su falta de homogeneidad con el resto puesta de manifiesto en el contraste anterior

H₀= las muestras de adultos y larvas se comportan de manera homogénea

Para contrastarlo se realiza un test de homogeneidad chi-cuadrado, tomando $\alpha=5\%$. Se muestran el nivel de significación estándar y una corrección secuencial de Bonferroni (Rice 1988) para ensayos múltiples. Los valores de P se muestran en la columna Valor P Homogen. Se acepta (*ns*) la H₀ si $P > \alpha/k$. En caso de rechazo (*s*) se contrasta en color rojo, en caso de discrepancia con la aproximación estándar se contrasta en color azul.

Sólo en el cruce 4C2-C3 adultos y larvas se comportan de modo significativamente diferente. El fragmento 4A1 (color azul), tendría diferencias con significación marginal, pues se encuentra en la zona de incertidumbre dependiente de si se aplica o no la corrección de Bonferroni

H₀=las muestras de todos fragmento se comportan de manera homogénea respecto a la razón sexual

Se realiza una chi-cuadrado de homogeneidad con los datos de la tabla anterior que devuelve un valor altamente significativo (valor $P < 0.001$), por lo que se rechaza la hipótesis y se concluye que los distintos fragmentos se comportan de manera distinta

Sin embargo, el análisis del estadístico de contraste nos ofrece información sobre la desproporción que el fragmento 4D1-D5 aporta a las diferencias, por lo que planteamos la misma hipótesis excluyendo este segmento. En este caso, el valor $P = 0,35$ nos permite afirmar con un nivel de significación del 5% que el resto de las muestras se comportan de manera uniforme

Heterocigotos simples :

Los datos de la siguiente tabla muestran el comportamiento de los cruces de cada línea homocigota con las poblaciones con las que comparten fondo genético.

Heterocigotos simples								
<u>padre</u>	<u>madre</u>	Larvas			Adultos			<u>Valor P Homogen.</u>
		<u>macho</u>	<u>hembra</u>	<u>g</u>	<u>macho</u>	<u>hembra</u>	<u>g</u>	
A1	<i>D. buzzatii(w)</i>	49	101	0,33 ^{***} /s	80	167	0,32 ^{***} /s	0,9543 ns/ns
A4-B3 (I)	<i>D. buzzatii(w)</i>	42	108	0,28 ^{***} /s	92	171	0,35 ^{***} /s	0,1450 ns/ns
A4-B3 (II)	<i>D. buzzatii(w)</i>	33	117	0,22 ^{***} /s	39	179	0,18 ^{***} /s	0,3287 ns/ns
C2-C3	<i>D. buzzatii(w)</i>	41	109	0,27 ^{***} /s	32	176	0,15 ^{***} /s	0,0056 ^{**} /ns
D1-D5	<i>D. buzzatii(w)</i>	52	98	0,35 ^{***} /s	82	125	0,40 ^{**} /s	0,3407 ns/ns
E1-E5(w)	<i>D. buzzatii(w)</i>	55	95	0,37 ^{**} /s	79	121	0,40 ^{**} /s	0,5894 ns/ns
<i>D. buzzatii(w)</i>	A1	83	67	0,55 s/ns	119	123	0,49 ns/ns	0,2356 ns/ns
<i>D. buzzatii(w)</i>	A4-B3 (I)	70	80	0,47 ^{ns/ns}	95	105	0,48 ns/ns	0,8772 ns/ns
<i>D. buzzatii(w)</i>	A4-B3 (II)	83	67	0,55 ^{ns/ns}	97	103	0,49 ns/ns	0,2056 ns/ns
<i>D. buzzatii(w)</i>	C2-C3	73	79	0,48 ^{ns/ns}	115	107	0,52 ns/ns	0,4732 ns/ns
<i>D. buzzatii(w)</i>	D1-D5	94	56	0,63 ^{**} /s	147	92	0,62 ^{***} /s	0,8185 ns/ns
<i>D. buzzatii(w)</i>	E1-E5(w)	82	68	0,55 ^{ns/ns}	89	111	0,45 ns/ns	0,0597 ns/ns
A1	<i>D. buzzatii</i>	58	92	0,39 ^{**} /s	128	102	0,56 ns/ns	0,0012 ^{**} /s
A4-B3 (I)	<i>D. buzzatii</i>	74	76	0,49 ^{ns/ns}	109	107	0,50 ns/ns	0,8317 ns/ns
A4-B3 (II)	<i>D. buzzatii</i>	86	64	0,57 ^{ns/ns}	95	107	0,47 ns/ns	0,0558 ns/ns
C2-C3	<i>D. buzzatii</i>	100	50	0,67 ^{***} /s	158	54	0,75 ^{***} /s	0,1034 ns/ns
D1-D5	<i>D. buzzatii</i>	89	61	0,59 [*] /s	123	96	0,56 ns/ns	0,5453 ns/ns
E1-E5(w)	<i>D. buzzatii</i>	64	86	0,43 ^{ns/ns}	103	106	0,49 ns/ns	0,2152 ns/ns
<i>D. buzzatii</i>	A1	56	94	0,37 ^{**} /s	100	106	0,49 ns/ns	0,0353 [*] /ns
<i>D. buzzatii</i>	A4-B3 (I)	68	82	0,45 ^{ns/ns}	78	122	0,39 ^{**} /s	0,2344 ns/ns
<i>D. buzzatii</i>	A4-B3 (II)	76	74	0,51 ^{ns/ns}	126	123	0,51 ns/ns	0,2828 ns/ns
<i>D. buzzatii</i>	C2-C3	77	74	0,5 ns/ns	164	127	0,56 [*] /ns	0,4559 ns/ns
<i>D. buzzatii</i>	D1-D5	70	80	0,47 ^{ns/ns}	97	121	0,44 ns/ns	0,6810 ns/ns
<i>D. buzzatii</i>	E1-E5(w)	54	96	0,36 ^{***} /s	81	122	0,40 ^{**} /ns	0,9901 ns/ns

*** = $P < 0,001$ ** = $P < 0,01$ * = $P < 0,05$ (significación estandar) / ns=no significativo s=significativo (Bonferroni)

g = n° machos / total descendencia

Se plantean las siguientes hipótesis hipótesis:

H₀= las muestras de adultos y larvas se comportan de manera homogénea

Se realiza el mismo acercamiento que en el apartado similar de las líneas homocigotas.

Se acepta H₀ excepto en el cruce 4A1 x *D. buzzatii*, que se comporta de modo significativamente diferente, y discutible en 4C2-C3 x *D. buzzatii* (w)

H₀= las muestras provienen de poblaciones con una proporción de machos y hembras igual al 50%

En la tabla anterior, en rojo los cruces con desviaciones significativos del 50%. Se resaltan en color azul los cruces que en un análisis convencional provocarían rechazo de H₀ con un nivel de significación de hasta un 5%; pero que la corrección secuencial de Bonferroni (Rice 1988) acepta como no significativos. Nos parece interesante resaltarlos porque las diferencias reales entre el número de machos y hembras pueden llegar hasta el 20%. Esto nos da una medida de lo restrictivo de nuestro criterio para aceptar una diferencia como significativa y más considerando unos recuentos con un número de individuos de varios centenares.

En los cruces en los que existe dudas en la aceptación o rechazo de la H₀, un análisis de compendio de larvas y adultos confirma las diferencias significativas en todos los casos menos en *D. buzzatii* x 4C2-C3, que si es homogéneo. No se pudo realizar la suma de resultados de larvas y adultos en A1 x *D. buzzatii* por su falta de homogeneidad

*H₀= el defecto de machos de los cruces con hembras *D. buzzatii*(w) deriva de su fondo genético*

Se analizan los resultados comparados con los del cruce de las líneas de referencia (se compendian los valores de larvas y adultos y los de los fragmentos A4-B3 (I) y A4-B3 (II) por ser la misma región)

				g	Homogeneidad
a1	<i>D. buzzatii</i> (w)	129	268	0,32	ns/ns
a4-b3 (I) +(II)	<i>D. buzzatii</i> (w)	206	575	0,26	*** /s
C2-C3	<i>D. buzzatii</i> (w)	73	285	0,20	*** /s
D1-D5	<i>D. buzzatii</i> (w)	134	223	0,38	ns/ns
E1-E5	<i>D. buzzatii</i> (w)	134	216	0,38	ns/ns
<i>D. buzzatii</i> SL6	<i>D. buzzatii</i> SL101 w	65	119	0,35	
*** = P<0,001 ** = P<0,01 * = P<0,05 (significación estandar) / ns=no significativo s=significativo (Bonferroni)					

Las diferencias de ratio se explicarían por la cepa de referencia en el fragmento más pequeño. Al aumentar la aportación de *D. koepferae* esta causa no es resolutive, para volver a serlo en los más grandes. Esta incongruencia se solucionará en los siguientes análisis (ver página 134)

Heterocigotos dobles en trans :

Los datos de la siguiente tabla muestran el comportamiento de los cruces entre homocigotos de nuestras líneas transgénicas, cubriendo todas las posibilidades

<u>padre</u>	<u>madre</u>	<u>Larvas</u>			<u>Adultos</u>			<u>P Hom.</u>
		<u>macho</u>	<u>hembra</u>	<u>g</u>	<u>macho</u>	<u>hembra</u>	<u>g</u>	
A1	A4-B3 (I)	82	68	0,55 ns/ns	102	107	0,49 ns/ns	0,2730 ns/ns
A1	A4-B3 (II)	64	86	0,43 ns/ns	103	138	0,43 */ns	0,9888 ns/ns
A1	C2-C3	84	66	0,56 ns/ns	133	68	0,66 ***/s	0,0524 ns/ns
A1	D1-D5	93	57	0,62 **/ns	107	94	0,53 ns/ns	0,1008 ns/ns
A1	E1-E5(w)	46	104	0,31 ***/s	69	131	0,35 ***/s	0,4499 ns/ns
A4-B3 (I)	A1	74	76	0,49 ns/ns	105	119	0,47 ns/ns	0,6409 ns/ns
A4-B3 (I)	A4-B3 (II)	71	79	0,47 ns/ns	235	286	0,45 */ns	0,6293 ns/ns
A4-B3 (I)	C2-C3	73	77	0,49 ns/ns	394	356	0,53 ns/ns	0,3869 ns/ns
A4-B3 (I)	D1-D5	70	80	0,47 ns/ns	260	296	0,47 ns/ns	0,9833 ns/ns
A4-B3 (I)	E1-E5(w)	41	109	0,27 ***/s	146	383	0,28 ***/s	0,9487 ns/ns
A4-B3 (II)	A1	75	76	0,50 ns/ns	118	92	0,56 ns/ns	0,2204 ns/ns
A4-B3 (II)	A4-B3 (I)	90	60	0,60 */ns	263	330	0,44 **/ns	0,0006 ***/s
A4-B3 (II)	C2-C3	77	73	0,51 ns/ns	324	334	0,49 ns/ns	0,6436 ns/ns
A4-B3 (II)	D1-D5	79	71	0,53 ns/ns	264	222	0,54 ns/ns	0,7223 ns/ns
A4-B3 (II)	E1-E5(w)	55	95	0,37 **/s	68	216	0,24 ***/s	0,0052 **/ns
C2-C3	A1	67	83	0,45 ns/ns	98	112	0,47 ns/ns	0,7073 ns/ns
C2-C3	A4-B3 (I)	73	77	0,49 ns/ns	307	372	0,45 */ns	0,4424 ns/ns
C2-C3	A4-B3 (II)	94	84	0,53 ns/ns	286	352	0,45 **/ns	0,0591 ns/ns
C2-C3	D1-D5	75	75	0,50 ns/ns	266	297	0,47 ns/ns	0,5486 ns/ns
C2-C3	E1-E5(w)	43	107	0,29 ***/s	117	332	0,26 ***/s	0,5318 ns/ns
D1-D5	A1	72	78	0,48 ns/ns	104	115	0,47 ns/ns	0,9230 ns/ns
D1-D5	A4-B3 (I)	88	62	0,59 */ns	310	290	0,52 ns/ns	0,1244 ns/ns
D1-D5	A4-B3 (II)	93	57	0,62 **/ns	192	139	0,58 **/s	0,4089 ns/ns
D1-D5	C2-C3	92	58	0,61 **/ns	241	127	0,65 ***/s	0,3706 ns/ns
D1-D5	E1-E5(w)	65	85	0,43 ns/ns	133	206	0,39 ***/s	0,3943 ns/ns
E1-E5(w)	A1	79	71	0,53 ns/ns	104	110	0,49 ns/ns	0,4448 ns/ns
E1-E5(w)	A4-B3 (I)	65	85	0,43 ns/ns	235	337	0,41 ***/s	0,6188 ns/ns
E1-E5(w)	A4-B3 (II)	67	83	0,45 ns/ns	207	302	0,41 ***/s	0,3825 ns/ns
E1-E5(w)	C2-C3	70	80	0,47 ns/ns	259	275	0,49 ns/ns	0,6910 ns/ns
E1-E5(w)	D1-D5	91	59	0,61 **/ns	194	267	0,42 ***/s	0,0001 ***/s

*** = P<0,001 ** = P<0,01 * = P<0,05 (significación estandar) / ns=no significativo s=significativo (Bonferroni)

g = n° machos / total descendencia

H₀= las muestras provienen de poblaciones con una proporción de machos y hembras igual al 50%

Similar acercamiento al de homocigotos y heterocigotos simples. En los cruces en los que existen dudas en la aceptación o rechazo de la H₀ entre larvas y adultos, pero homogéneos, el análisis de la suma de ambos marca diferencias altamente significativas en todos los casos con un nivel de significación de al menos un 5%.

H₀= las muestras de adultos y larvas se comportan de manera homogénea

Se realiza el mismo acercamiento que en los apartados anteriores.

Se acepta H₀ excepto en los cruces 4A4B3(II) x 4A4B3(I), que en la práctica es un cruce entre homocigotos, y el 4E1E5 x 4D1D5, en el que podría tener importancia el hecho de que el fragmento 4D1-D5 homocigoto provoca defecto de hembras, con letalidad en la pupación (Carvajal, 1999), lo que explicaría la discrepancia

H₀= los cruces recíprocos se comportan de manera homogénea

		<u>Reciprocidad</u>	
Pares		Sign. est.	Corr. Bonf.
A1	w	***	S
A4-B3 (I)	w	***	S
A4-B3 (II)	w	***	S
C2-C3	w	***	S
D1-D5	w	***	S
A1	E1-E5(w)	***	S
A4-B3 (I)	E1-E5(w)	***	S
A4-B3 (II)	E1-E5(w)	***	S
C2-C3	E1-E5(w)	***	S
DbSL	E1-E5(w)	*	ns
A1	D1-D5	*	ns
A4-B3 (I)	D1-D5	*	ns
C2-C3	D1-D5	***	S
DbSL	D1-D5	***	S
A4-B3 (I)	C2-C3	*	ns
A1	C2-C3	***	S
DbSL	C2-C3	***	S
A1	A4-B3 (II)	**	S
A4-B3 (I)	DbSL	*	ns
A4-B3 (II)	D1-D5	ns	ns
A1	DbSL	ns	ns
A4-B3 (II)	C2-C3	ns	ns
A1	A4-B3 (I)	ns	ns
D1-D5	E1-E5(w)	ns	ns
A4-B3 (II)	DbSL	ns	ns

*** = P<0,001 ** = P<0,01 * = P<0,05 (significación estandar) (Bonferroni) ns=no significativo s=significativo

Se comparan por parejas los cruces recíprocos macho homocigoto A x Hembra homocigota B y su recíproco macho homocigoto B x Hembra homocigota A y se analizan el número de machos y hembras en la descendencia, sumando larvas y adultos. La significación que devuelven los test de homogeneidad chi-cuadrado se presenta en la tabla anterior. Dado el número de pruebas se realiza paralelamente una corrección secuencial de Bonferroni, que se muestra en la columna correspondiente. Este doble análisis deja una serie de datos con significación marginal, señalados en color azul.

Los pares de cruzamientos están ordenados de mayor a menor significación estadística

El primer resultado observable es que existe una significativa falta de homogeneidad en el 56% de los cruces recíprocos, más un 20% más de significación marginal, un total por tanto del 76%, notablemente alto

Esta falta de homogeneidad se explica en un 57% de los cruces significativos por participación de hembras progenitoras *D. buzzatii* SL 101 white, y 4E1-E5(w) en homocigosis, del mismo fondo genético. El análisis más detallado se realiza a continuación en el capítulo Cuantificación

Caracterización temporal

El comportamiento general entre adultos y larvas es uniforme. Podemos afirmar, por tanto, que el desequilibrio en la proporción de sexos no se origina ni en la fase de adulto, ni en la de pupa (crítica en el desarrollo), sino que ya están presentes en las larvas. Indica un efecto anterior: en la eclosión, en la formación temprana del embrión o incluso en la formación de gametos. De todas maneras hay que significar que existen cruces concretos en los que la intensidad del efecto parece variar entre larvas y adultos e incluso orientaciones opuestas.

Cuantificación

Para la cuantificación general de los resultados se emplean los datos correspondientes al compendio de larvas y adultos de líneas homogéneas.

Se usa la transformación $|g-0,5|$ para poder comparar en paralelo cruces con defecto en el número de uno de los sexos. En color rojo los cruces de diferencia significativa y en azul aquellos con significación discutible según se usa un acercamiento estándar o una corrección de Bonferroni (Rice 1988). Se ordenan por valor de $|g-0,5|$ descendente, es decir, de mayor a menor desequilibrio y en columnas con defecto de machos y de hembras.

defecto de machos			defecto de hembras		
padre	madre	$ g-0,5 $			$ g-0,5 $
A4-B3 (II)	<i>D. buzzatii(w)</i>	0,304	C2-C3	<i>D. buzzatii</i>	0,213
C2-C3	<i>D. buzzatii(w)</i>	0,296	D1-D5	C2-C3	0,143
C2-C3	E1-E5(w)	0,233	D1-D5	D1-D5	0,135
A4-B3 (I)	E1-E5(w)	0,225	<i>D. buzzatii(w)</i>	D1-D5	0,120
A4-B3 (II)	E1-E5(w)	0,217	A1	C2-C3	0,118
A4-B3 (I)	<i>D. buzzatii(w)</i>	0,176	D1-D5	A4-B3 (II)	0,093
A1	<i>D. buzzatii(w)</i>	0,175	D1-D5	<i>D. buzzatii</i>	0,075
A1	E1-E5(w)	0,171	A1	D1-D5	0,070
D1-D5	<i>D. buzzatii(w)</i>	0,125			
<i>D. buzzatii</i>	E1-E5(w)	0,118			
E1-E5(w)	<i>D. buzzatii(w)</i>	0,117			
A4-B3 (I)	A4-B3 (I)	0,108			
E1-E5(w)	E1-E5(w)	0,106			
D1-D5	E1-E5(w))	0,095			
E1-E5(w)	A4-B3 (I)	0,084			
E1-E5(w)	A4-B3 (II)	0,084			
<i>D. buzzatii</i>	A4-B3 (I)	0,083			
E1-E5(w)	D1-D5	0,079			
A1	A4-B3 (II)	0,073			
<i>D. buzzatii</i>	A1	0,062			
A4-B3 (I)	A4-B3 (II)	0,044			
C2-C3	A4-B3 (I)	0,042			
C2-C3	A4-B3 (II)	0,034			

$|g-0,5| = \text{valor absoluto de } ((n^{\circ}\text{machos}/\text{total descendencia})-0,5)$

La observación de esta selección de los datos generales induce varios resultados:

1.- Los fragmentos de mayor tamaño tienen una mayor influencia:

No se han presentado en este capítulo datos de tamaño introgresado, pero remitimos al capítulo “Causalidad” (página 136) para la demostración de esta afirmación

2.- El defecto de hembras está frecuentemente relacionado con el fragmento 4D1-D5

En 75% de los cruces en los que aparece un defecto significativo de hembras aparece el fragmento 4D1-D5 como progenitor.

3.- Es más frecuente el desequilibrio sexual hacia menos machos que hacia menos hembras

En un primer acercamiento comprobamos el ajuste a la distribución normal tanto de las distribuciones de descendientes machos y hembras realizando una prueba de Kolmogorov-Smirnov respecto al total de datos.

	<u>Machos</u>	<u>Hembras</u>
<i>Z de Kolmogorov-Smirnov</i>	1,630	1,479
<i>Sig. asintót. (bilateral)</i>	0,010	0,025

Tomando un nivel de significación del 5% podemos descartar el ajuste a la distribución normal, pues la probabilidad asociada a nuestras muestras cae en zona de rechazo.

Tras esta comprobación previa aplicamos para aplicamos una prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, con la siguiente hipótesis nula

H_0 = el desequilibrio hacia machos en la proporción sexual es igual que hacia hembras

		<u>Rangos</u>		
		<u>N</u>	<u>Rango promedio</u>	<u>Suma de rangos</u>
<u>Hembras - Machos</u>	Rangos negativos	21 ^a	24,67	518,00
	Rangos positivos	38 ^b	32,95	1252,00
	Empates	1 ^c		
	Total	60		

a. Hembras < Machos b. Hembras > Machos c. Hembras = Machos

El estadístico de contraste Z de Wilcoxon toma un valor de -5,462, con una probabilidad asociada de $P = 0,006$. Como este valor es menor que 0'05, rechazamos H_0 , y podemos afirmar que es más frecuente el desequilibrio sexual hacia menos machos que hacia hembras

4.-El cruce de híbridos homocigotos con hembras E1-E5 (fondo genético *D. buzzatii(w)*) produce defecto de machos

En la tabla siguiente se extraen datos de la tabla general y se contrastan por un lado el desequilibrio en ratio sexual (columna g) y también se complementa la tabla de la página 128 respecto al fondo genético genético *D. buzzatii(w)* (columna Homogeneidad)

				g	Homogeneidad
a1	E1-E5	115	235	0,33***/s	ns/ns
a4-b3 (I) +(II)	E1-E5	310	803	0,38***/s	***/s
C2-C3	E1-E5	160	439	0,27***/s	***/s
D1-D5	E1-E5	198	291	0,40***/s	ns/ns
<i>D. buzzatii</i> SL 6	E1-E5	135	218	0,38***/s	ns/ns
<i>D. buzzatii</i> SL101 w	E1-E5	171	179	0,49 ns/ns	***/s
<i>D. buzzatii</i> SL6	<i>D. buzzatii</i> SL101 w	65	119	0,35***/s	referencia

*** = $P < 0,001$ ** = $P < 0,01$ * = $P < 0,05$ (significación estándar) / ns=no significativo s=significativo (Bonferroni)

Todos los cruces producen desviaciones significativas de la ratio sexual excepto *D. buzzatii* SL101 w x E1-E5, único cruce en el que machos y hembras comparten fondo genético

En la homogeneidad respecto a la cepas de referencia el resultado se repite: el fondo genético explicaría los datos de los fragmentos más grandes y el más pequeño, al menos en un primer análisis sólo, pero es destacable que el cruce en el que machos y hembras comparten fondo genético no son homogéneos por ratio equilibrada, no por eliminar significativamente más machos en la descendencia, como ocurre en el resto.

5.-El cruce con machos de la línea 4D1-D5 produce defecto de hembras

Se presentan datos compendiados de larvas y de dos réplicas de adultos, todos ellos agrupados tras la comprobación de su comportamiento homogéneo. Se presentan también los datos sumados de 4A4-B3 (I) y (II), porque representan en esencia el mismo fragmento y se ha comprobado que sus resultados son homogéneos tanto en adultos como en larvas. Se separan de los otros los fragmentos con fondo genético *D. buz. SL 101 white*

♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	Valor P
D1-D5	a4-b3 (I)	398	352	0,093
D1-D5	a4-b3 (II)	285	196	0,000
D1-D5	a4-b3 (I)+(II)	683	548	0,000
D1-D5	C2-C3	333	185	0,000
D1-D5	<i>D. buz. SL(6)</i>	212	157	0,004
D1-D5	E1-E5(W)	198	291	0,000
D1-D5	<i>D. buz. SL 101 white</i>	134	223	0,000

El resultado es evidente, aunque se produce desequilibrio de la ratio sexual, las direcciones son distintas según el fondo genético del que se trate. La probable explicación es que asistimos a un triple efecto combinado: el fondo genético *D. buz. SL 101 white* y el material genético de *D. koepferae* (análisis en páginas 128, 138 y la anterior) eliminaría machos; por otro lado los machos progenitores 4D1-D5 reducirían hembras en la descendencia.

6.-El cruce con la línea 4A1 produce comportamiento desigual de larvas y adultos

El 90% de los cruces presentan comportamiento homogéneo entre larvas y adultos. En la mitad de los no homogéneos interviene el fragmento 4A1, por lo que se extraen los datos de las tablas generales para una mayor claridad de exposición

		<u>Larvas</u>			<u>Adultos</u>			<u>Homogeneidad larvas-adultos</u>
		g			g			
<i>a1</i>	<i>D. buzzatii SL6</i>	58	92	0,39***/s	128	102	0,56	**/s
<i>D. buzzatii SL6</i>	<i>a1</i>	56	94	0,37***/s	100	106	0,49	*/ns
<i>a1</i>	<i>a1</i>	59	96	0,38**/s	271	285	0,49	*/ns
<u>Homogeneidad entre cruces</u>		ns			ns			
suma		173	282	0,38	499	493	0,50	***/s

*** = $P < 0,001$ ** = $P < 0,01$ * = $P < 0,05$ (significación estándar) / ns=no significativo s=significativo (secuencial Bonferroni)

Se observa que en los cruces en los que interviene este fragmento en solitario hay un comportamiento homogéneo: hay una diferencia significativa de machos en las larvas que luego se compensa entre adultos, de ahí las diferencias que muestra el estadístico de contraste en este caso.

Sin embargo los análisis realizados a los cruces donde interviene este fragmento combinados otros de *D. koepferae* no se repite este comportamiento. Las combinaciones con *D. buz. SL 101 white* tampoco resultan informativas por predominar el efecto de su fondo genético (ver página anterior)

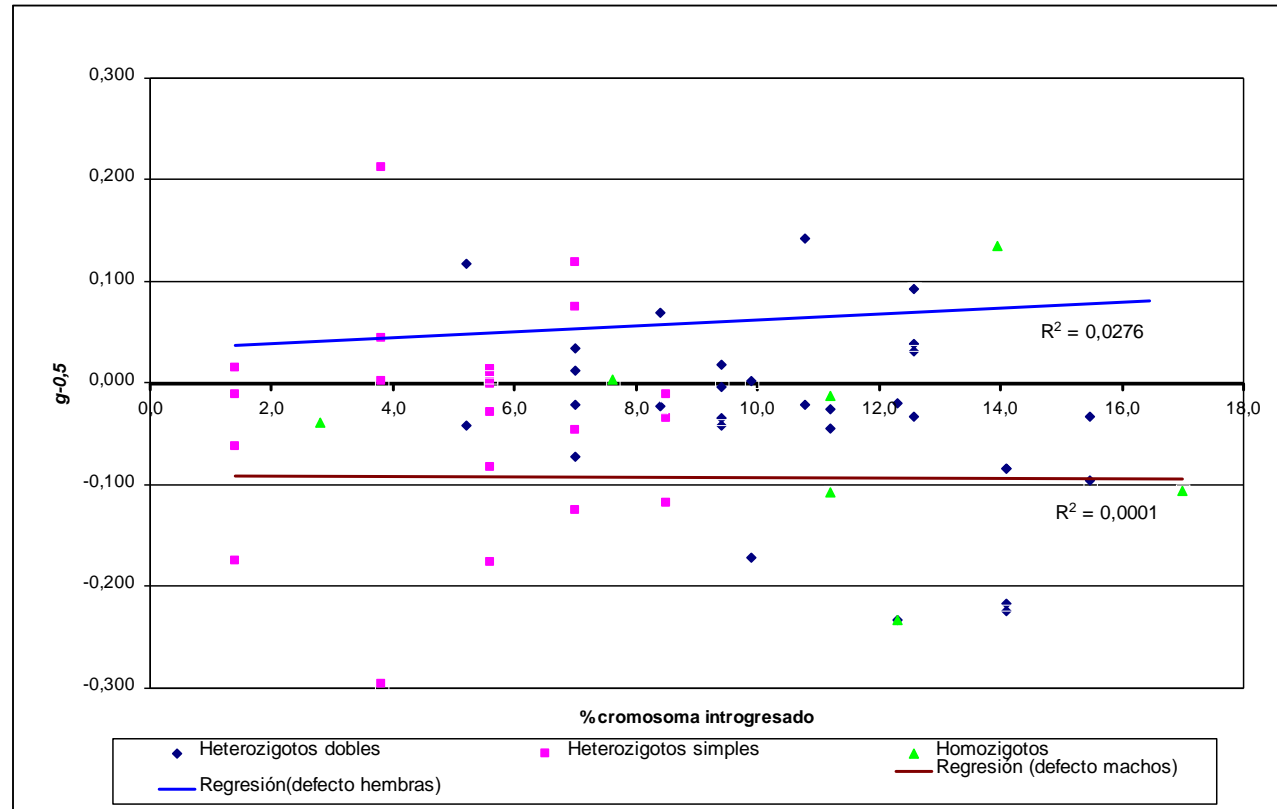
Causalidad

En la siguiente tabla se expone el porcentaje aportado por cada fragmento en heterocigosis. Las distintas combinaciones de los cruces generan distintos porcentajes como suma de estos valores básicos.

	(solo)	A1	A4-B3 (I)	A4-B3 (II)	C2-C3	D1-D5	E1-E5(W)
A1	1,86	3,72	8,32	8,32	5,54	8,64	9,36
A4-B3 (I)	6,46		12,92	12,92	10,14	13,24	13,96
A4-B3 (II)	6,46			12,92	10,14	13,24	13,96
C2-C3	3,68				7,36	10,46	11,18
D1-D5	6,78					13,56	14,28
E1-E5(W)	7,5						15

en solo se considera el fragmento introgresado en un homólogo respecto al total de los dos homólogos

Se construyo un diagrama de dispersión el que se compara el efecto sobre la proporción de sexos medido con el parámetro $g-0,5$ de la suma de todos los datos disponibles respecto a la cantidad de cromosoma introgresado, medido como porcentaje sobre el tamaño total de ambos homólogos del cromosoma 4.



En el gráfico se representan las líneas de regresión correspondientes a los cruzamientos que producen defecto de hembras (azul) y machos (marrón), junto con sus valores de R^2 . Las tres categorías (heterocigotos dobles, sencillos y homocigotos) se representan con puntos en distinto color. A la hora del análisis se agrupan los valores mayores que cero (defecto de hembras) y menores (defecto de machos).

Se contrasta las hipótesis:

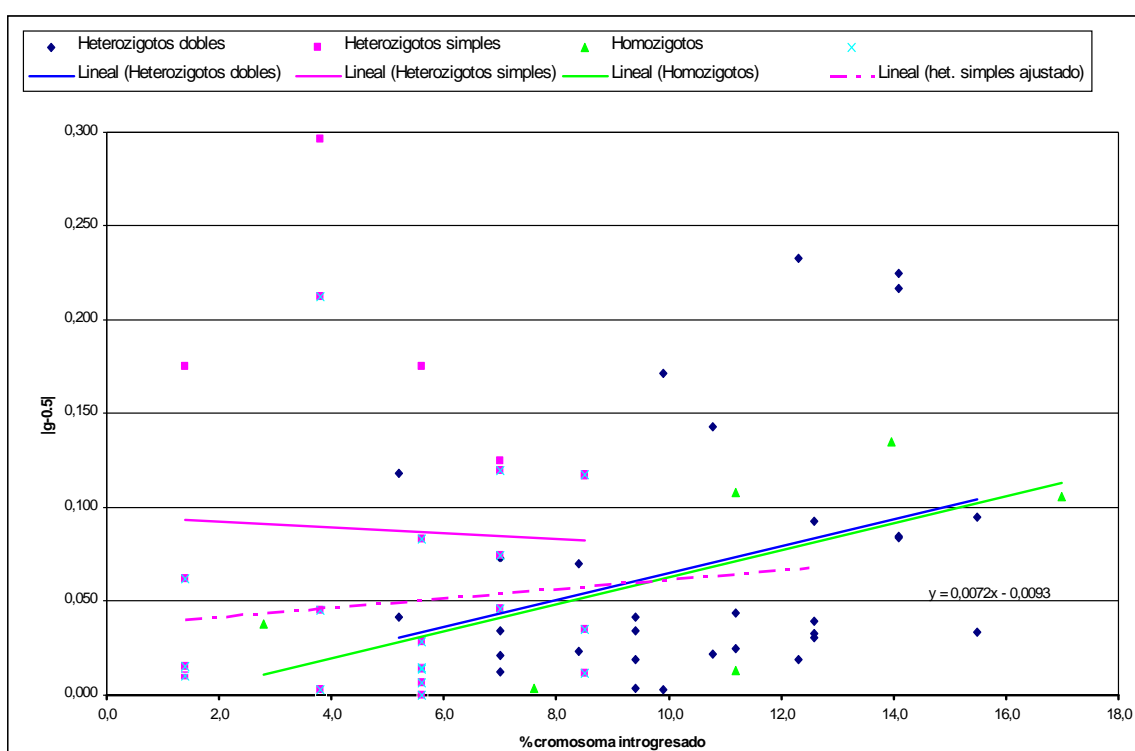
H_0 = los cruces que producen defecto de hembras tienen una correlación significativa con la variable tanto por cien de cromosoma introgresado

El índice de correlación correspondiente da un valor de 0.166. Para un nivel de significación de 0,05 y 20 grados de libertad ($=n-L$, donde son los grados de libertad, n el tamaño de la muestra y L el nº de variables), las tablas devuelven un valor $r(0.05, 20) = 0.423$, mínimo para un coeficiente de correlación significativo. Como $r=0.166 < 0.423$ se rechaza la hipótesis.

H_0 = los cruces que producen defecto de machos tienen una correlación significativa con la variable tanto por cien de cromosoma introgresado

Con el mismo planteamiento $r=0.01$, $=36$, $r(0.05, 36)=0.3208$. Como $r=0.01 < 0.3208$ se rechaza la hipótesis. En otras palabras, no se observa que un aumento en la cantidad de cromosoma sustituido afecte primero a un sexo y luego al otro, o a ambos.

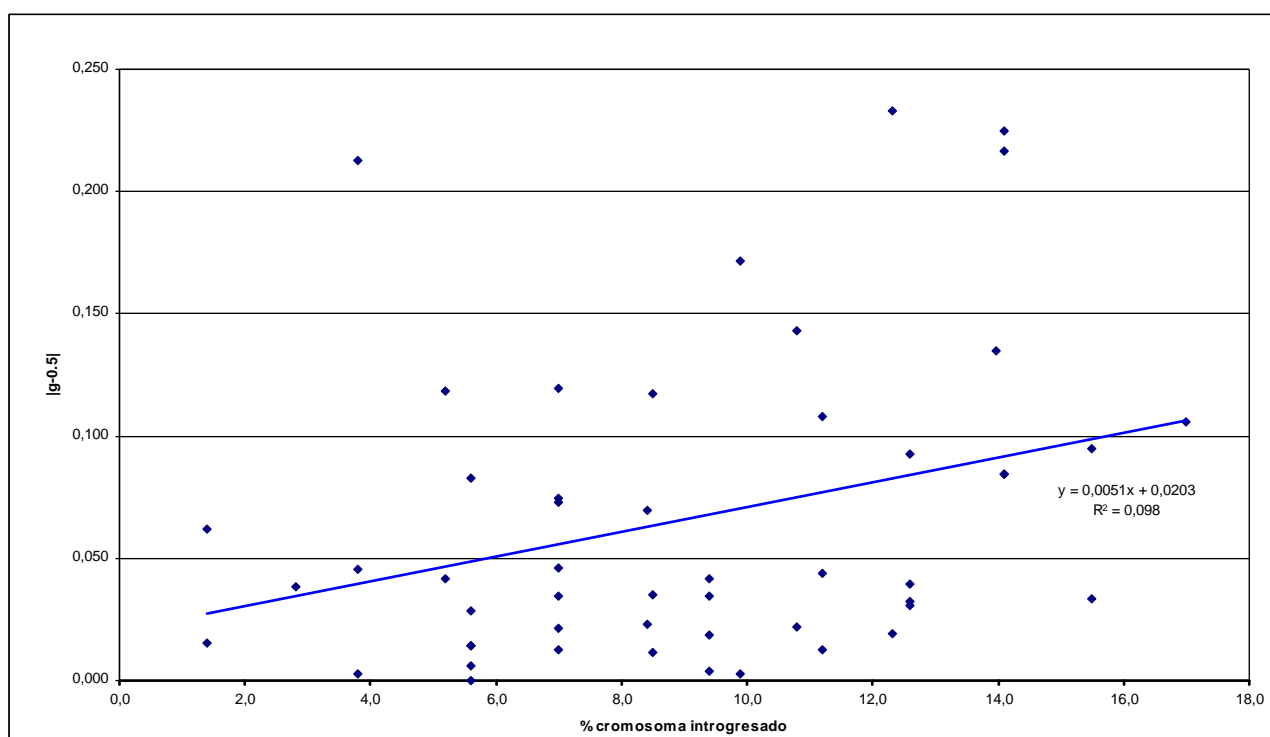
Paralelamente se realizó otro gráfico similar pero con valor de ordenadas $|g-0,5|$. Esta transformación elimina el efecto del sexo para dejar sólo la intensidad de desviación de la proporción sexual respecto al 50%. Se construyó también una recta de regresión para las tres categorías de heterocigotos dobles, simples y homocigotos.



El primer acercamiento indica que el aumento de la cantidad de cromosoma ajeno desequilibra la proporción de sexos respecto al 50% (valor 0). También destacamos que la línea de regresión de homocigotos y heterocigotos dobles coincide exactamente, lo que podría indicar un comportamiento de fondo equiparable

La diferencia en la línea correspondiente a heterocigotos simples se ven muy influenciados por el efecto de los cruces con hembras *D. buzzatii* (*w*), y falsea la comparación con las otras dos categorías. La eliminación de esos datos y del valor extremo del cruce 4C2-C3 x *D. buzzatii* revela una línea de regresión (punteada) cercana a las otras dos.

Para estimar si estas apreciaciones son significativas transformamos la gráfica uniformizando las tres categorías en una, y eliminando valores citados anteriormente:



Se contrasta la hipótesis:

H_0 = el efecto en la proporción sexual de líneas híbridas tiene una correlación significativa con la variable tanto por cien de cromosoma introgresado

El coeficiente de correlación de Pearson para estas dos variables calculado da un valor de 0,3130. Para un nivel de significación de 0,05 y 49 grados de libertad, el valor mínimo es $r(0.05, 49) = 0.276$. Como $r=0.3130 > 0.276$ aceptamos la hipótesis y podemos concluir que la introducción de un fragmento de cromosoma tiene influencia sobre la proporción de los sexos en la descendencia.

Letales *pseudoequilibrados*

La naturaleza genéticamente heterogénea de estas líneas debido a su obtención (gráfico página 83) no posibilita un análisis tan exhaustivo, ni permite un cruzamiento con otras líneas que de una descendencia homogénea que se pueda comparar con los resultados anteriores.

Se realizaron por tanto recuentos cromosómicos a partir de larvas de tercer estadio y de adultos con los siguientes resultados

larvas (ordenación cromosómica)					adultos			
<u>4B3-C2/4B3-C2</u>		<u>4B3-C2/4 s</u>		<u>4s/4 s</u>				
♂♂	♀♀	♂♂	♀♀		<u>Total</u>	♂♂	♀♀	<u>Total</u>
19	3	40	27	0	89	252	173	425
<u>4G3-G5/4G3-G5</u>		<u>4G3-G5/4 s</u>		<u>4s/4 s</u>				
2	5	18	30	0	55	173	198	371

Se contrasta:

H₀: el número de machos es significativamente igual al de hembras

Aplicando una chi-cuadrado sobre valores esperados del 50%, se acepta la hipótesis nula con un nivel de significación de 0.05 en larvas homocigotas ($P=0.25$), heterocigotas ($P=0.08$) y adultos ($P=0.19$) de la línea 4G3-G5, y en larvas heterocigotos ($P=0.11$) de la 4B3-C2

Se rechaza en las larvas homocigotas ($P=0.0006$) y en adultos de la 4B3-C2 ($P=0.0001$). En estos casos se observa una fuerte reducción de hembras. Ambos resultados son coherentes pues la falta de larvas hembras homocigotas se refleja en los adultos resultantes.

Se puede afirmar por tanto que el fragmento 4B3-C2 contiene un factor de inviabilidad para las hembras, que se manifiesta en fase anterior a la formación de larvas o bien una distorsión de la segregación en la formación de gametos.

H₀: el número de larvas homocigotas y heterocigotos se corresponde con una proporción 1/3:2/3

Planteamos la hipótesis asumiendo primero que los homocigotos que puedan llegar a adultos no dejan descendencia representativa en la siguiente generación, ya sea por inviabilidad o esterilidad, y que toda la descendencia proviene de cruces entre cepas heterocigotas, de ahí la proporción utilizada de 1/3:2/3 (los descendientes 4s/4s llevan un letal que las hace desaparecer de los cálculos)

El resultado de una chi-cuadrado sobre los valores esperados con un nivel de significación de 0.05 es de aceptación en el caso de 4B3-C2 ($P=0.08$), pero en zona de incertidumbre y de rechazo en el de 4G3-G5 ($P=0.001$).

No hay que deducir de ello un error en la asunción del tipo de cruzamiento, sino que la observación de los datos indica que en ambos casos el rechazo o la aceptación condicionada se produce por la existencia de una proporción muy baja de larvas homocigotas, en ambos sexos en 4G3-G5 y de hembras en 4B3-C2. Los contrastes realizados asumiendo algún tipo de aportación a la descendencia de los individuos homocigotos para cualquiera de los dos fragmentos entra en zona de rechazos con probabilidades asociadas de varios órdenes de magnitud negativa, siempre más intensa que la expuesta anteriormente, por lo que podemos asegurar que la descendencia obtenida proviene de cruzamientos 4B3-C2/4s x 4B3-C2/4s y 4G3-G5/4s x 4G3-G5/4s, con una menor relevancia de larvas homocigotas, por inviabilidad o desequilibrio gamético.

Una vez fijado el tipo de cruzamiento, contrastamos:

H₀: el número de machos y hembras adultos de la línea 4B3-C2 sigue una proporción 3/5:2/5

Contrastamos esta proporción modificando la clásica 1:2:1 por la certeza de letalidad en la ordenación 4s/4 s y asumiéndola en las hembras 4B3-C2/4B3-C2.

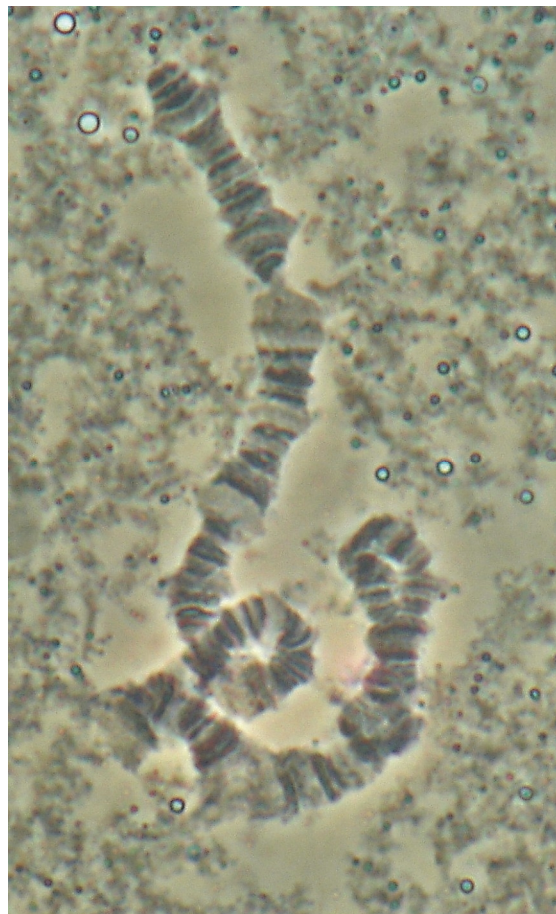
La chi-cuadrado nos confirma un buen ajuste a lo esperado con un nivel de significación de 0.05 (valor $P=0.766$), por lo que aceptamos la proporción propuesta y las asunciones que hacemos, es decir, que no existen hembras homocigotas adultas en la descendencia.

La consecuencia de estas dos últimas hipótesis es que muy probablemente exista descendencia homocigota adulta masculina, pero su falta de aportación a la descendencia señala posibles problemas de esterilidad.

La otra zona descrita se ha intentado poner en homocigosis mediante otro acercamiento consistente en cruzar líneas heterocigotas 4G1-G3/s con 4F4-H/st. El resultado debería proporcionar descendencia homocigota para la intersección de ambos fragmentos, como realmente aparece en el análisis de cromosomas politénicos de larvas. El siguiente cruzamiento de la descendencia entre si debería producir una línea estable de homocigotos 4G1-G3 o desvelar problemas de esterilidad

Sin embargo, de los 16 cruzamientos realizados de este tipo, en cuatro no hubo fecundación, en ocho el

número de larvas era tan pequeño (4-5) que no se pudieron analizar sus cromosomas politénicos y sólo en cinco se pudo diagnosticar el tipo de larvas. De ellos sólo cuatro dejaron descendencia adulta. El resumen de resultados se expone a continuación:



Cromosoma 4 resultante de un cruce 4G1-G3/s x 4F4-H/st.

Primer cruce					adultos		
larvas (ordenación cromosómica)							
<u>4G1-G3/4F4-H</u>	<u>4 F4-H/s</u>	<u>4s/4st</u>	<u>4G1-G3/4st</u>	<u>Total</u>	♂♂	♀♀	<u>Total</u>
5	3	3	7	18	40	52	92

Se pudieron fundar seis cruzamientos con la descendencia, y todos ellos respondían a unos genotipos paternos 4G1-G3/4st x 4s/4st. La explicación de esos datos es la mortalidad o esterilidad de los homocigotos, más probable la primera, aunque el pequeño número de cruces no permite una discriminación mayor



La combinación de todos los resultados nos permite afirmar la probable existencia de dos zonas de inviabilidad híbrida anterior al estado de larva de tercer estadio para cada uno de esos fragmentos. En 4B3-C2 sería sexo-dependiente afectando a las hembras, y produciendo machos adultos probablemente estériles. En 4G3-G5 la letalidad se daría en ambos sexos.

Si añadimos al análisis la baja efectividad de los cruces 4G1-G3/s x 4F4-H/st y la falta de genotipos homocigotos adultos para el fragmento en el segundo cruce, es muy probable que 4G1-G3 también provoque inviabilidad. La explicación más lógica en este segmento cromosómico, dada la mínima cantidad de factores de inviabilidad a lo largo del cromosoma 4 encontrados en este trabajo es que exista sólo uno en la intersección de 4G1-G3 y 4G3-G5, es decir, en 4G3

*Detalle de la imagen anterior.
Se observan asinapsis en 4G3-G5 y en 4F4-G3.
La zona intermedia sin asinapsis, 4G1-G3,
correspondería a la homocigosis, es decir, a la
sustitución total de ese fragmento cromosómico*

Aunque se han mantenido durante años estables, la recombinación en los fragmentos de *D. buzzatii* con el correspondiente de *D. koepferae* es posible. Cuando ocurre el fragmento de esta última especie se pierde muy rápidamente, más si cabe por su carácter deletéreo y termina superando los controles periódicos a los que se sometía a todas las líneas creadas. En este caso la línea era repuesta a partir de su réplica independiente. Sin embargo esta situación se ha dado simultáneamente en las dos réplicas y ha derivado en la pérdida de la línea. En este caso el sistema de letales se desequilibra y la ordenación 4s letal también va

progresivamente desapareciendo. A fecha de hoy ese letal sólo se mantiene en lo que fue la línea 4 G3-G5/s (letal), habiendo desaparecido ya en las otras.

Resumen de resultados del apartado

Los 60 tipos de cruzamientos realizados:

- 1.-Se comportan homogéneamente si se repiten, es decir, son replicables
- 2.-Larvas y los adultos también se comportan homogéneamente excepto en cuatro tipos de cruzamientos.
- 3.- El efecto de la introgresión de un fragmento cromosómico ajeno en el desequilibrio sexual es frecuente Se presentan desviaciones significativas de la proporción sexual en un 56 % de los cruces y significación marginal en otro 20%.
- 4.- Los cruces no suelen ser homogéneamente recíprocos Es importante el sexo del progenitor, aparte del efecto del fragmento introgresado en si.
- 5.- La descendencia de machos con cualquier fragmento en homocigosis frente a hembras *D. buzzatii(w)* presenta un defecto de machos. No ocurre lo mismo con hembras *D. buzzatii SL6*
- 6.- El efecto del desequilibrio en la proporción sexual responde no sólo de la posición cromosómica, sino al tamaño de la introgresión independientemente de su posición.
- 7.- No se aprecia un efecto diferencial de la magnitud de la introgresión respecto al sexo, aunque exista un menor número de cruces que producen defecto de hembras
- 8.- Parecen existir dos zonas de inviabilidad híbrida, una en 4B3-C2, letal para hembras en fase inicial de desarrollo y de probable esterilidad para los machos, y otra en 4G3, de inviabilidad también temprana.

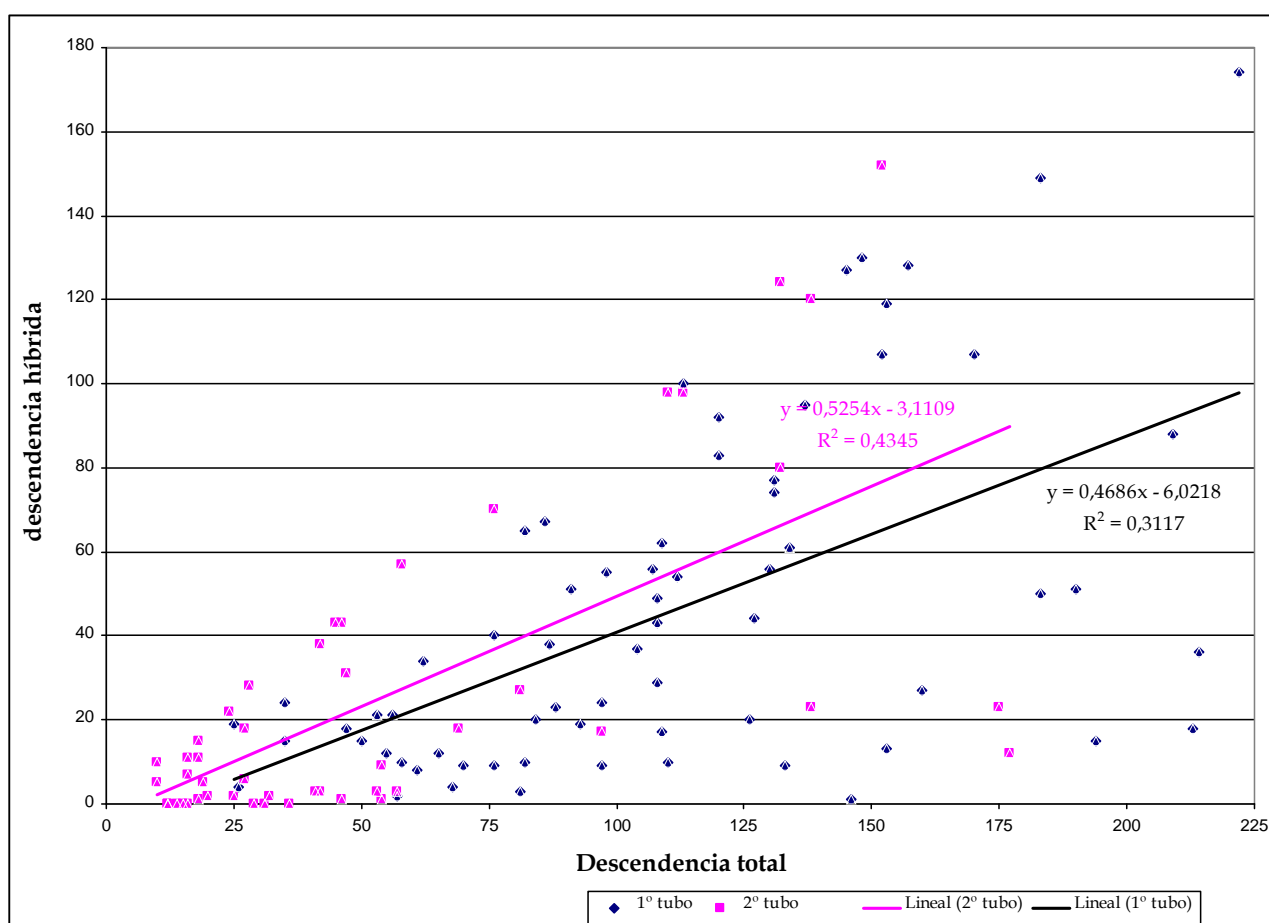
ESTUDIO DE LA PRODUCTIVIDAD

Intentamos en este apartado un acercamiento al nivel de *fitness* que presentan nuestras líneas híbridas por comparación con las cepas de referencia. Las diferencias significativas en esta comparación podrán poner de manifiesto las posibilidades de supervivencia en estado natural y las cepas que presentan inviabilidad en ambos sexos.

Como ya se comentó (página 89) las alteraciones de la ratio sexual subestimaría una posible inviabilidad en el caso de que ambos sexos la presenten. Para detectarlo desarrollaremos también este capítulo

Diferencias de productividad entre series

El primer análisis se centra en determinar si existen diferencias entre las dos series secuenciales del diseño experimental. Para ello realizamos un gráfico de dispersión que relaciona el número de descendientes de cruces híbridos frente a descendientes totales, en las dos series secuenciales 1º y 2º tubo.



A la vista del gráfico ya se puede observar que su pendiente no es muy diferente de 0.5, valor esperado si la aportación de híbridos y referencias salvajes fuera la misma. También se observa un agrupamiento de valores del segundo tubo en la zona de baja producción. Para una comprobación rigurosa se contrastan las siguientes hipótesis:

H₀: existe relación entre la aportación relativa de los híbridos y el número de descendientes totales

Para testar esta hipótesis calculamos el coeficiente de correlación r de la variable número de descendientes de cruces híbridos divididos por el total, frente al número de descendientes totales. Los datos y resultado se presentan en la siguiente tabla:

	r	$r(0.05, N-2)$
1° tubo	0,136	0,241
2° tubo	0,144	0,288
Compendio	0,125	0,195

En todos los casos el coeficiente calculado es menor que el teórico significativo, por lo que rechazamos la hipótesis de relación en los tres casos.

Esta falta de relación indicaría que la aportación de los híbridos no se ve afectada por la densidad de individuos presentes en el vial. El resultado consecuente es que o bien no se han alcanzado el nivel crítico que provoque competencia o bien que la competencia no influya en el desarrollo de los híbridos.

H₀: El número de descendientes es igual en ambas series

Para decidir qué prueba estadística utilizar se ha realizado un contraste de ajuste a la distribución normal del número de descendientes de ambas series. El resultado se presenta en la siguiente tabla:

	<u>1° tubo</u>	<u>2° tubo</u>
Parámetros normales	Media	109,44
	Desviación típica	39,25
Z de Kolmogorov-Smirnov	49,11	46,45
Sig. asintót. (bilateral)	0,611	1,642
	0,850	0,009

El primer acercamiento nos lo da la diferencia entre las medias, de un 65% menor en el segundo tubo. Sin embargo, con un nivel de significación de un 5% no podemos aceptar que la segunda serie siga una distribución normal, por lo que aplicamos un test de los rangos con signos de Wilcoxon.

		<u>N</u>	<u>Rango promedio</u>	<u>Suma de rangos</u>
<u>2° tubo - 1° tubo</u>	Rangos negativos	41 ^a	27,33	1120,50
	Rangos positivos	7 ^b	7,93	55,50
	Empates	1 ^c		
	Total	49		

a. 2° tubo < 1° tubo b. 2° tubo > 1° tubo c. 2° tubo = 1° tubo

Para 2° tubo > 1° tubo el estadístico de contraste Z de Wilcoxon toma un valor de -2,770, con una probabilidad asociada de $P = 0,000$. Como este valor es menor que 0'05, rechazamos H_0 , y podemos afirmar que es el primer tubo de la serie tiene una producción mayor que el segundo.

Con este resultado intentamos determinar a que se debe la diferencia, realizando un acercamiento similar al anterior y discriminando las categorías de 1° y segunda serie, y de híbridos y referencia.

Comprobamos primero si siguen una distribución normal mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov

		<u>1° tubo (hib)</u>	<u>2° tubo(hib)</u>	<u>1° tubo (ref)</u>	<u>2° tubo(ref)</u>
Parámetros normales	Media	45,32	18,51	64,11	20,73
	Desviación típica	40,64	33,34	42,57	32,84
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,40	2,38	1,30	2,17
Sig. asintót. (bilateral)		0,038	0,000	0,066	0,000

Como se puede observa, sólo el primer tubo de la referencia presenta un ajuste a la distribución normal con un nivel de significación del 5%. Elegimos de nuevo el test de los rangos con signos de Wilcoxon

Se contrasta:

H_0 = el número de descendientes híbridos y de referencia (salvaje) del primer tubo son igualmente frecuentes

		<u>N</u>	<u>Rango promedio</u>	<u>Suma de rangos</u>
<u>1° tubo (ref) - 1° tubo (hib)</u>	Rangos negativos	24 ^a	33,15	795,50
	Rangos positivos	44 ^b	35,24	1550,50
	Empates	0 ^c		
	Total	68		

a. 1° tubo (ref) < 1° tubo (hib) b. 1° tubo (ref) > 1° tubo (hib) c. 1° tubo (ref) = 1° tubo (hib)

El estadístico de contraste Z de Wilcoxon toma un valor de -2,307, con una probabilidad asociada de $P = 0,021$. Como este valor es menor que 0'05, rechazamos H_0 , y podemos afirmar que híbridos y referencias

no se comportan igual, y los cruces salvajes aportan una significativamente mayor cantidad de descendientes que los híbridos.

H_0 = las número de descendientes híbridos y de referencia (salvaje) del segundo tubo son igualmente frecuentes

		<u>N</u>	<u>Rango promedio</u>	<u>Suma de rangos</u>
<u>1° tubo (ref) - 1° tubo (hib)</u>	Rangos negativos	23 ^a	27,37	629,50
	Rangos positivos	31 ^b	27,60	855,50
	Empates	14 ^c		
	Total	68		

a. 2° tubo(ref) < 2° tubo(hib) b. 2° tubo(ref) > 2° tubo(hib) c. 2° tubo(ref) = 2° tubo(hib)

En cambio, en este caso no podemos rechazar la hipótesis nula dado que el estadístico de contraste tiene un valor de -0.973, con valor P de 0.331, mayor que 0,05, por lo tanto en zona de aceptación estadística: aportan la misma cantidad de descendientes.

H_0 = las número de descendientes de híbridos del primer y segundo tubo son igualmente frecuentes

		<u>N</u>	<u>Rango promedio</u>	<u>Suma de rangos</u>
<u>2° tubo(hib) - 1° tubo (hib)</u>	Rangos negativos	52 ^a	35,18	1829,50
	Rangos positivos	14 ^b	27,25	381,50
	Empates	2 ^c		
	Total	68		

a. 2° tubo(hib) < 1° tubo (hib) b. 2° tubo(hib) > 1° tubo (hib) c. 2° tubo(hib) = 1° tubo (hib)

Este es un caso de rechazo, con valor del estadístico de -4,625 y probabilidad asociada igual a 0,000, demostrando una mayor descendencia del primer tubo de híbridos.

H_0 = las número de descendientes de referencia (salvaje) del primer y segundo tubo son igualmente frecuentes

		<u>N</u>	<u>Rango promedio</u>	<u>Suma de rangos</u>
<u>2° tubo(ref) - 1° tubo (ref)</u>	Rangos negativos	61 ^a	34,98	2133,50
	Rangos positivos	7 ^b	30,36	212,50
	Empates	0 ^c		
	Total	68		

a. 2° tubo(ref) < 1° tubo (ref) b. 2° tubo(ref) > 1° tubo (ref) c. 2° tubo(ref) = 1° tubo (ref)

Aquí es donde se obtiene un mayor valor del estadístico (-5,869). La probabilidad de que ocurra esta distribución de datos es del 0,000. Por tanto, rechazamos la hipótesis nula y concluimos que las descendencias del primer tubo son más abundantes que las del segundo.

Para eliminar un efecto de una posible mayor longevidad de las *Drosophila* salvajes se repitieron los análisis respecto al aporte de descendientes por hembra.

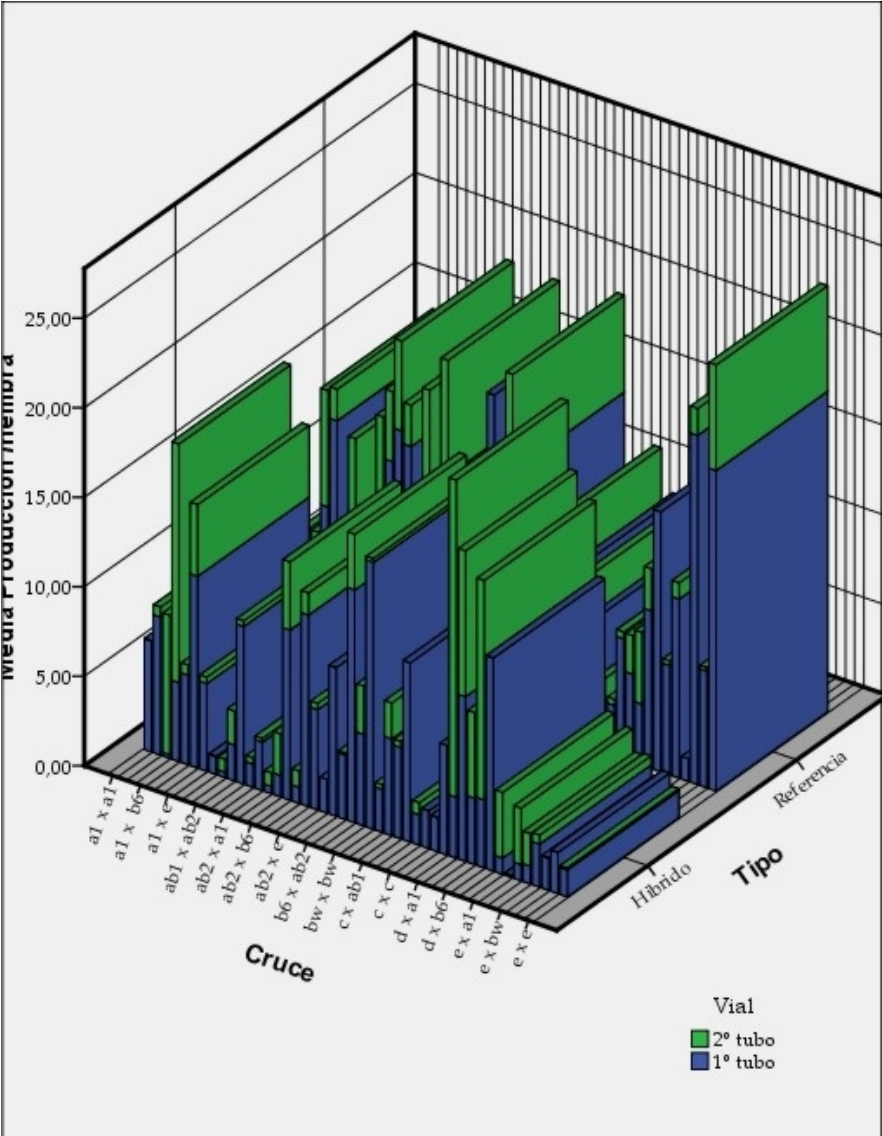
El contraste respecto a la distribución normal repite datos, y sólo la muestra *1º tubo(ref)* se ajusta a la distribución normal. Los datos de contraste con el test de Wilcoxon se muestran en la siguiente tabla

	<i>Z de Wilcoxon</i>
<u>1º tubo (hib) frente a 1º tubo (ref)</u>	-2.111*
<u>1º tubo (hib) frente a. 2º tubo(hib)</u>	-3.982***
<u>1º tubo (ref) frente a 2º tubo (ref)</u>	-5.380***
<u>2º tubo(hib) frente a 2º tubo (ref)</u>	-0.916ns

*** = $P < 0,001$ ** = $P < 0,01$ * = $P < 0,05$

Los análisis estadísticos confirman con un nivel de confianza de al menos un 5% que los resultados anteriores son correctos y no sesgados por una mayor número de hembras de alguna clase en el segundo tubo. Sólo los segundos tubos tienen un nivel de producción comparable entre si.

Como conclusión del apartado podemos afirmar que existen diferencias significativas entre el número de descendientes del primer y segundo tubo, tanto en el total como en las categorías de híbridos y referencia salvaje. Sin embargo, la observación de las medias muestrales y el hecho de la igualdad de comportamiento en híbridos y referencia del segundo tubo indicarían que las diferencias globales se deben fundamentalmente a un descenso muy fuerte de producción en las cepas de referencia del primer al segundo tubo. No se observa en ningún caso efectos debidos a la competencia.



Efectos sobre la proporción sexual

Se intenta hacer analizar en esta apartado si las condiciones del diseño experimental influyen preferentemente en uno u otro sexo. Para ello comenzamos con un test de homogeneidad para contrastar la hipótesis

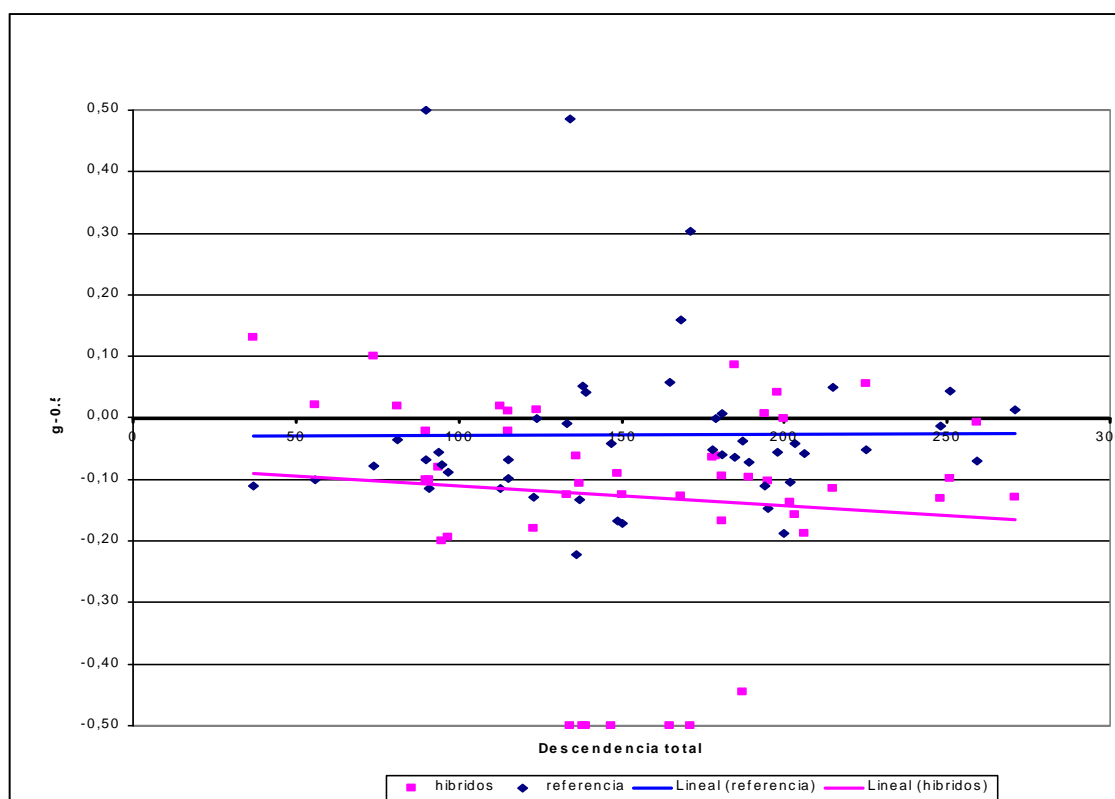
H_0 : el comportamiento en la proporción entre sexos de ambas series es homogéneo

Se manejan ahora datos desglosados por sexo de híbridos y referencia salvaje de cada serie de tubo de cultivo.

Se toma como nivel de significación un 5% y se aplican un contraste de homogeneidad chi cuadrado, aplicando la corrección de Yates si alguno de los valores esperados es menor que cinco. En el caso de que algún valor esperado sea menor que tres se utiliza el test exacto de Fisher

En todos los casos los valores resultantes entran claramente en zona de aceptación, por lo que aceptamos la hipótesis nula: ambas series se comportan de la misma manera.

La siguiente aproximación se basa en el análisis gráfico de los datos de ambas series sumando datos de machos y hembras, relacionado la descendencia total con el parámetro $(g - 0,5) [(n^\circ \text{ machos}/\text{total}) - 0,5]$.



Se contrasta:

H_0 = El número de individuos producidos tienen relación con el parámetro $g-0.5$ (proporción entre sexos)

El coeficiente de correlación lineal se muestra en esta tabla:

	r	N	$r(0.05, N-2)$
<i>Híbridos</i>	0,1008	47	0,288
<i>Referencia</i>	0,0079	47	0,288

En ambos casos se rechaza la hipótesis y podemos concluir que la densidad de individuos en los tubos de cría no tiene influencia sobre la proporción entre sexos.

Ahora nos preguntamos si pese a no observar un efecto general en la proporción entre sexos, pudiera existir algún efecto local específico que quedara enmascarado por el conjunto. Para ello nos planteamos la hipótesis:

H_0 = La proporción sexual de los cruces criados junto a referencia salvajes es igual a los criados sin ella.

En otras palabras, comparamos los datos obtenidos en este apartado de híbridos coexistiendo con las líneas originales, con los datos obtenidos en el apartado de inviabilidad, donde el desarrollo se produjo en condiciones genéticas homogéneas.

El análisis de homogeneidad chi cuadrado cruce a cruce tomando como criterio de discriminación el 0,05, y tras aplicar una corrección secuencial de Bonferroni (Rice 1988) da como resultado un comportamiento homogéneo en la mayoría de los casos (80%) y heterogéneo en el 20%

Concretamente, los cruces que se diferencian son los siguientes, ordenados por hembra progenitora son:

<i>padre</i>	<i>madre</i>	<i>Datos de productividad</i>			<i>Datos de inviabilidad</i>			<i>Esperados</i>
		$\bar{}$	$\bar{}$	<i>suma</i>	$\bar{}$	$\bar{}$	<i>suma</i>	
<i>A1</i>	<i>c</i>	20	35	55	217	134	351	34,0
<i>ab2</i>	<i>c</i>	1	17	18	401	407	808	8,9
<i>d</i>	<i>c</i>	48	71	119	333	185	518	76,5
<i>d</i>	<i>ab2</i>	30	50	80	285	196	481	47,4
<i>ab2</i>	<i>d</i>	44	74	118	343	293	636	63,6
<i>d</i>	<i>d</i>	89	85	174	652	375	1027	110,5
<i>d</i>	<i>ab1</i>	65	84	149	398	352	750	79,1
<i>ab2</i>	<i>ab2</i>	20	41	61	531	559	1090	29,7
<i>DbSL</i>	<i>ab2</i>	52	83	135	202	197	399	68,3
<i>ab1</i>	<i>DbSL</i>	94	140	234	183	183	366	117,0
<i>c</i>	<i>DbSL</i>	11	12	23	258	104	362	16,4

En azul se exponen los datos que aceptamos como homogéneos, pero que entrarían en zona de rechazo sin aplicar la corrección secuencial de Bonferroni(Rice 1988). En la columna *Esperados* se calculan los

machos que deberían aparecer en los datos de productividad asumiendo un comportamiento uniforme con los de inviabilidad.

Comprobamos la hipótesis:

H₀= La frecuencia de las diferencias respecto a lo esperado se reparte uniformemente en los cruces no homogéneos

Para contrastarlo aplicamos un test de signos tomando como valores las diferencias entre el número de machos en los cruces de productividad y los valores esperados respecto a los datos de inviabilidad.

El contraste nos da una probabilidad asociada a nuestra hipótesis $P=0.000$, por lo que debemos rechazar la hipótesis. El test nos desvela también que en 11 de los 11 casos los machos esperados superan a los obtenidos

Por lo tanto podemos afirmar como resultado que el origen de la falta de uniformidad en esos cruces es debido a una disminución significativa del número de machos.

Podríamos pensar que este efecto se produce en el resto de las líneas, pese a ser homogéneas. Contrastamos entonces que:

H₀= La frecuencia de las diferencias respecto a lo esperado se reparte uniformemente en los cruces homogéneos

Con un planteamiento paralelo realizamos un test de los signos con el resto de los datos, que nos devuelve una probabilidad de $0.377 > 0,05$. Aceptamos por lo tanto la hipótesis nula, y concluimos el reparto uniforme de las diferencias. Es decir, el efecto observado en el análisis anterior es propio de ese tipo de cruces.

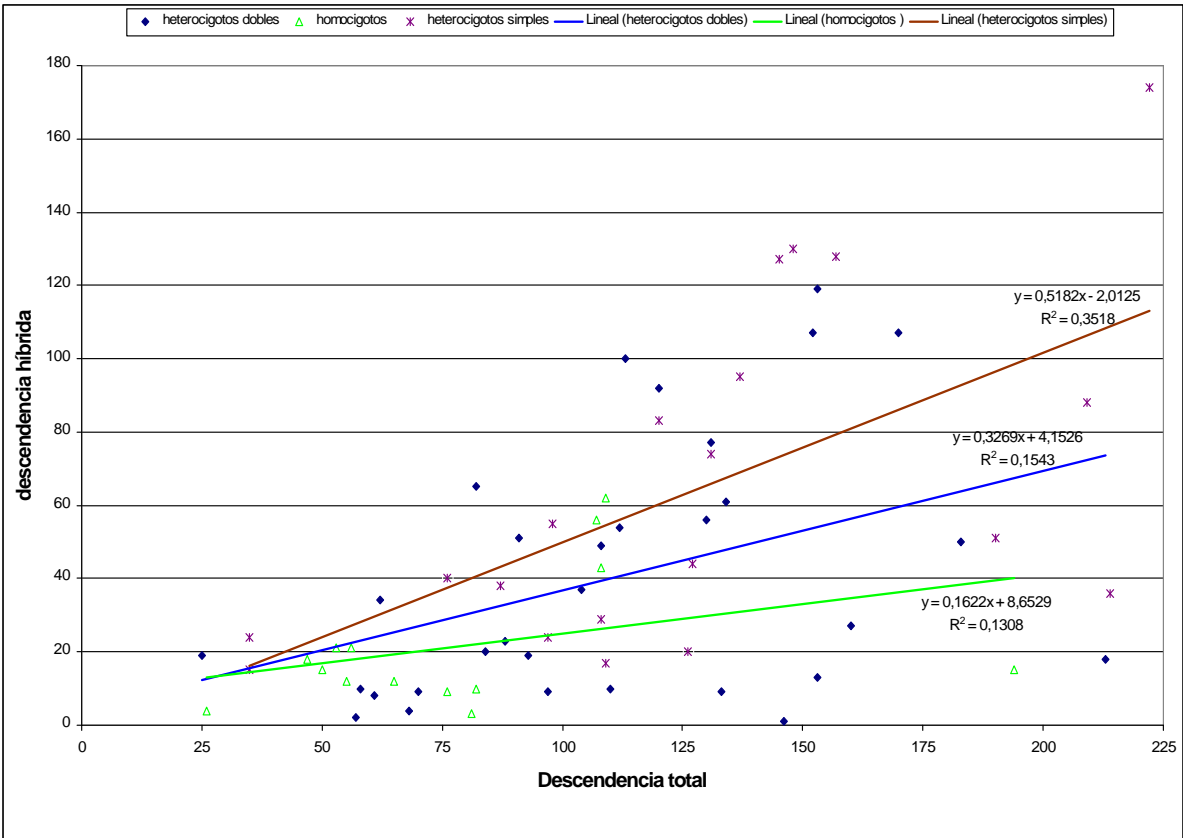
Se repitieron los análisis considerando los cruces distribuidos en la zona límite de aceptación (en azul en la tabla anterior) en uno u otro grupo (homogéneos o no) sin cambio en el rechazo o aceptación de las hipótesis propuestas

Resaltamos de nuevo que los cruces realizados con hembras homocigotas que portan el fragmento 4E1-E5(w) no se incluyen por la imposibilidad de discriminar machos de referencia e híbridos, pero el cruce 4E1-E5(w) x 4E1-E5(w) (la referencia en este caso es *D.buzzatii* SL 6 w*) si deja descendencia en una proporción comparable, confirmado con hasta tres réplicas realizadas homogéneas con un nivel de significación del 5%. También los cruces 4E1-E5(w) x *D.buzzatii* (salvaje) y el 4E1-E5(w) x *D.buzzatii* (white) son homogéneos con los datos de inviabilidad

Diferencias entre categorías

Abordamos ahora un análisis separando las distintas categorías de cruces (homocigotos, heterocigotos simples y dobles) para observar su comportamiento.

Se considerará primero la descendencia total híbrida de ambos tubos respecto a la descendencia total, como medida de la *fitness* total de cada categoría



Se aprecian comportamientos diferentes. Los heterocigotos simples ofrecen una pendiente de 0.518, prácticamente esperada para un aportación comparable entre híbridos y salvajes. En el otro lado los homocigotos, con una pendiente de 0,16, se alejan del equilibrio hacia una aportación pequeña a la descendencia total. El comportamiento de los heterocigotos dobles es intermedio. Contrastamos

H₀: existe relación entre la aportación relativa de los híbridos y el número de descendientes totales en cada categoría

Analizamos el grado de correlación de las categorías en la siguiente tabla:

	<i>r</i>	<i>N</i>	<i>r</i> (0.05, <i>N</i> -2)
<i>Heterocigotos simples</i>	0,737	23	0,413
<i>Heterocigotos dobles</i>	0,399	31	0,355
<i>Homocigotos</i>	0,487	14	0,532

El análisis estadístico robustece la apreciación gráfica: a mayor descendencia total, los heterocigotos simples aportan proporcionalmente más descendientes, comportándose como las líneas salvajes. Los

homocigotos, en cambio, aumentan su aporte de una manera mucho menor, resultando la diferencia significativa con un criterio del 0'05. Los heterocigotos dobles son intermedios, con relación aceptable pero bordeando la zona de rechazo. Para una comparación más precisa contrastamos:

H₀: las muestras provienen de la misma población

Para escoger la prueba estadística aplicamos test de normalidad

<i>Parámetros normalesa</i>	<i>Media</i>	<i>Heterocigotos</i>	<i>Homocigotos</i>	<i>Heterocigotos</i>
		<i>dobles</i>		<i>simples</i>
		55,22	34,92	91,73
	<i>Desviación típica</i>	44,10	37,68	74,75
	<i>Z de Kolmogorov-Smirnov</i>	0,892	0,923	0,704
	<i>Sig. asintót. (bilateral)</i>	0,404	0,361	0,704

En los tres casos aceptamos que los datos se ajustan a una distribución normal con un nivel de significación del 5%.

El test de homogeneidad de varianzas de Levene toma un valor de 0,014, menor que 0,05 por lo que no podemos aceptar igualdad de varianzas, por lo que escogemos un test de Kruskal-Wallis para comparar las muestras.

El valor $K=0,014 < 0,05$, por lo que se rechaza la hipótesis de que las muestras provengan de la misma población.

Una vez que se ha determinado que existen diferencias, aplicamos la prueba de rango *post hoc* de Games-Howell para varianzas distintas:

		<i>Error típico</i>	<i>Sig.</i>
<i>Heterocigotos dobles</i>	<i>Homocigotos</i>	12,81332 ^{ns}	0,268
	<i>Heterocigotos simples</i>	17,48541 ^{ns}	0,108
<i>Homocigotos</i>	<i>Heterocigotos dobles</i>	12,81332 ^{ns}	0,268
	<i>Heterocigotos simples</i>	18,55812*	0,012
<i>Heterocigotos simples</i>	<i>Heterocigotos dobles</i>	17,48541 ^{ns}	0,108
	<i>Homocigotos</i>	18,55812*	0,012

El resultado de este test reafirma el análisis gráfico: el grupo heterogéneo es el de homocigotos. Sin embargo sólo es significativamente diferente respecto a los heterocigotos simples, y no a los dobles. Podría interpretarse entonces un comportamiento intermedio de estos últimos.

Resumen de resultados del apartado

- La producción de las hembras fértiles disminuye drásticamente tras la primera semana de vida. Este efecto es especialmente potente en las hembras salvajes, y más reducido en las híbridas
- Existen procesos de disminución de la producción de los híbridos asociados tanto al tamaño de cromosoma introgresado como a posición relativa del material: máxima en homocigotos, mínima en heterocigotos simples e intermedia en los dobles
- Se dan también disminución de la producción de los híbridos asociados a efectos locales dependientes de la zona que se introgrese
- La disminución de productividad se centra principalmente en el sexo heterogamético

ESTUDIO DEL DESARROLLO

Tipología

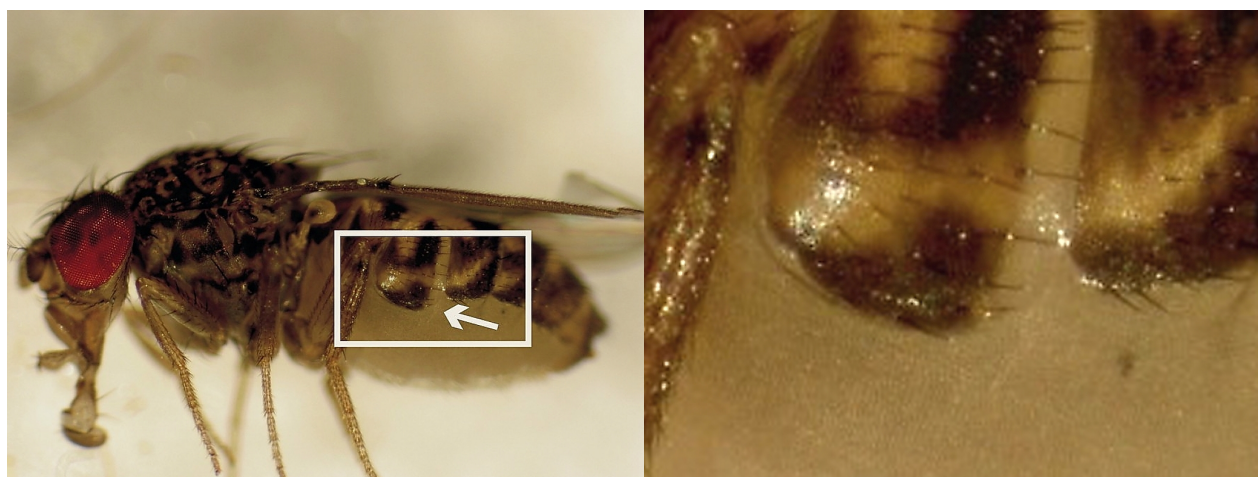
Las deformaciones observables a la lupa encontradas a lo largo de este estudio se muestran a continuación. Aquí no se las relaciona con las distintas arquitecturas cromosómicas: eso se detalla en el capítulo de cuantificación

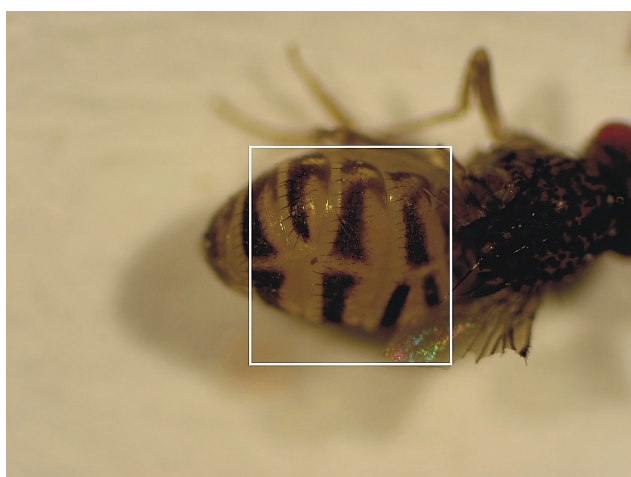
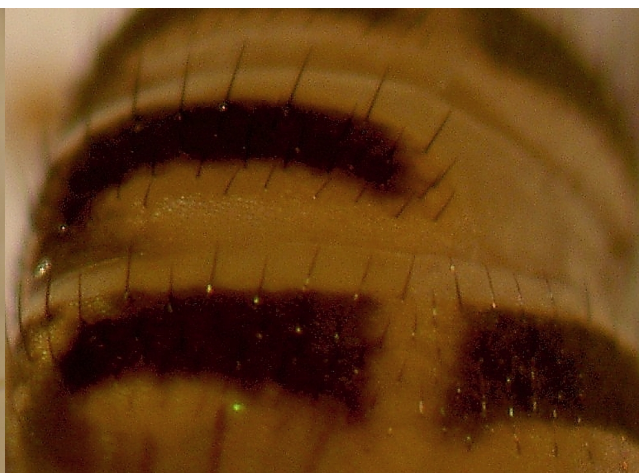
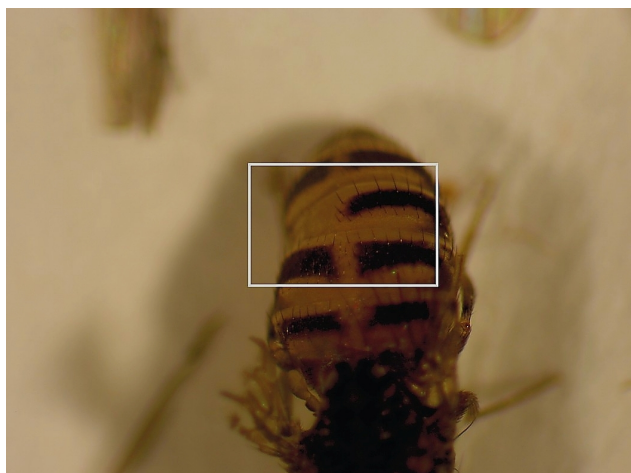
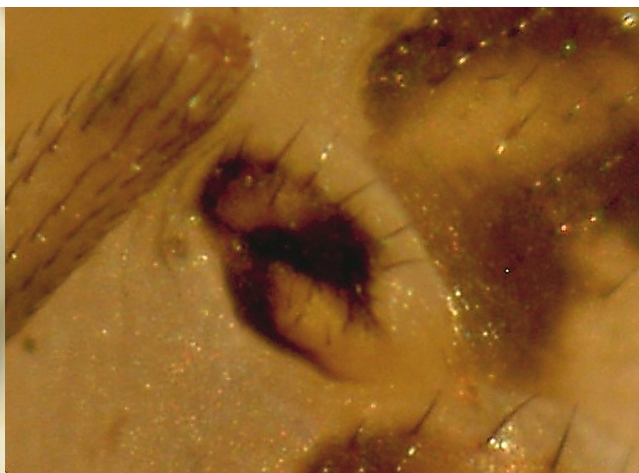
Las moscas portadoras de estas deformaciones presentan un índice de supervivencia muy corto en el tiempo y pocas dejaron descendencia. Un grado de disfunción como el observado hizo imposible una mayor caracterización sobre aspectos como esterilidad, viabilidad en condiciones ambientales no óptimas, etc. De todos modos se puede suponer consecuencias muy graves en cualquier aspecto relativo a la *fitness* general.

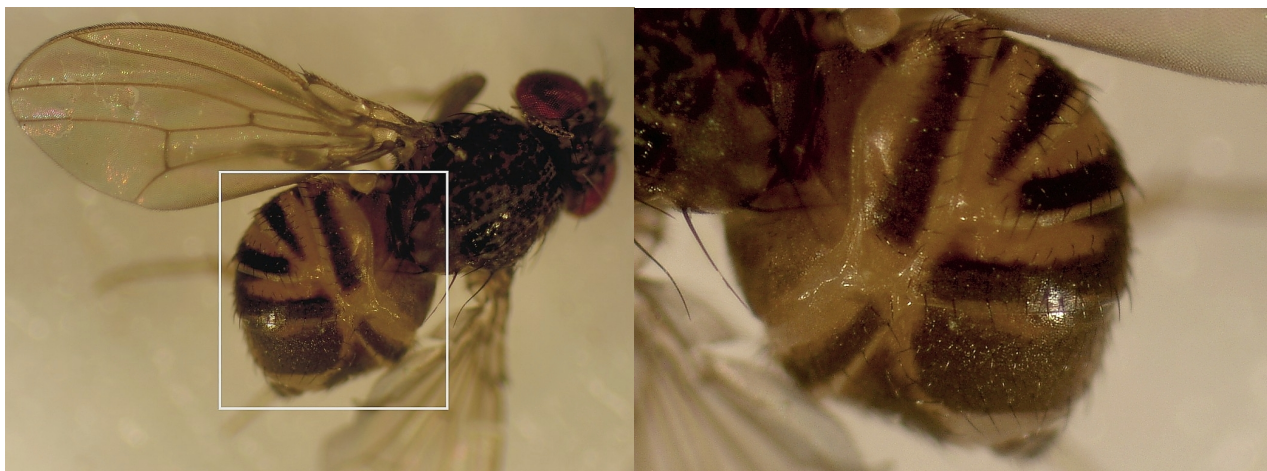
Abdomen anormal

Surge como consecuencia de la reducción, eliminación o desplazamiento de uno o varios segmentos abdominales en una de las mitades del cuerpo, aunque en algún caso esta deformidad se da en segmentos alternativos en cada lado

Al ser una anomalía de sencilla observación, frecuente y generalizada hemos podido establecer una gradación desde una situación de difícil diagnóstico práctico a una total deformidad del abdomen. En las fotografías que acompañan al texto podemos observar la gradación citada







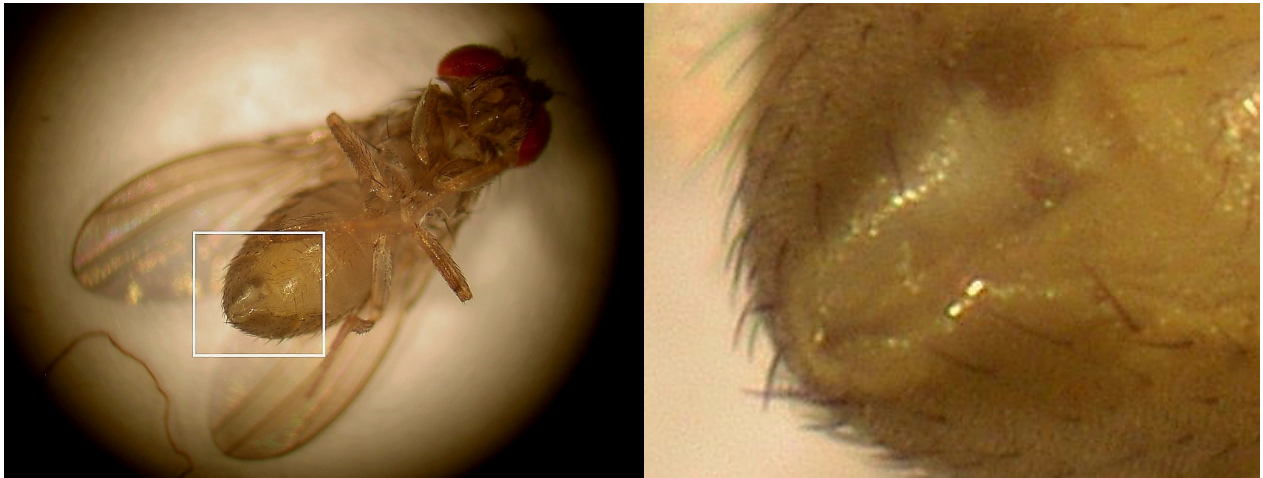
Genitalia

Genitalia rotada y separada del último segmento



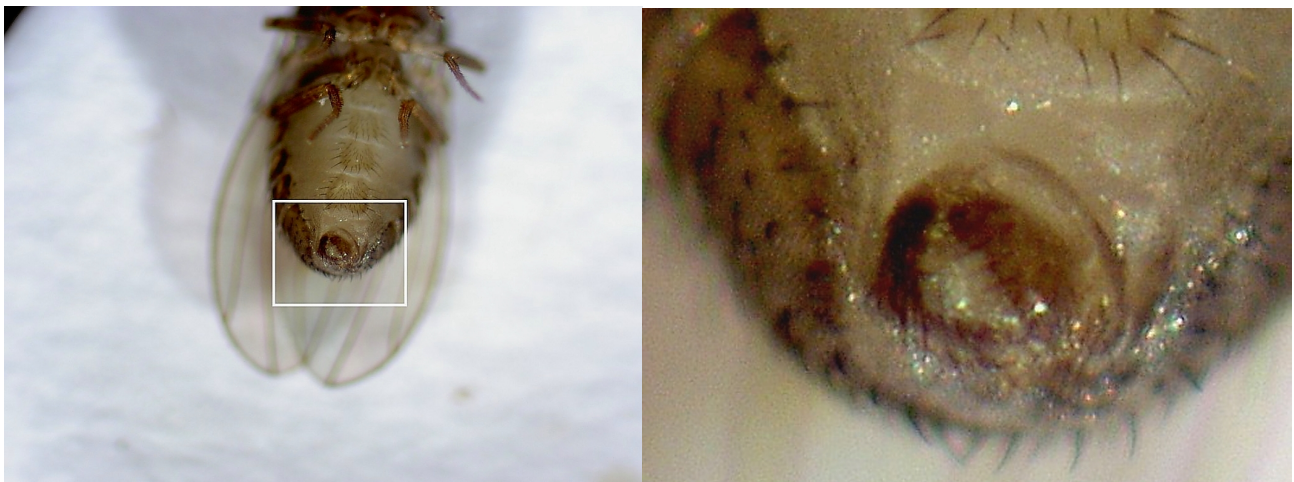
Sin genitalia externa

Se han dado casos en los que la genitalia no estaba completamente desarrollada y se observaron unos rudimentos de genitales bajo la cutícula, aunque en este caso no existe rotación.



Genitalia rotada

Probablemente es la misma deformidad descrita ya, aunque tal vez en un grado menos severo. Se observa que la genitalia externa rota hasta 90° respecto al eje de simetría del cuerpo.



Alas

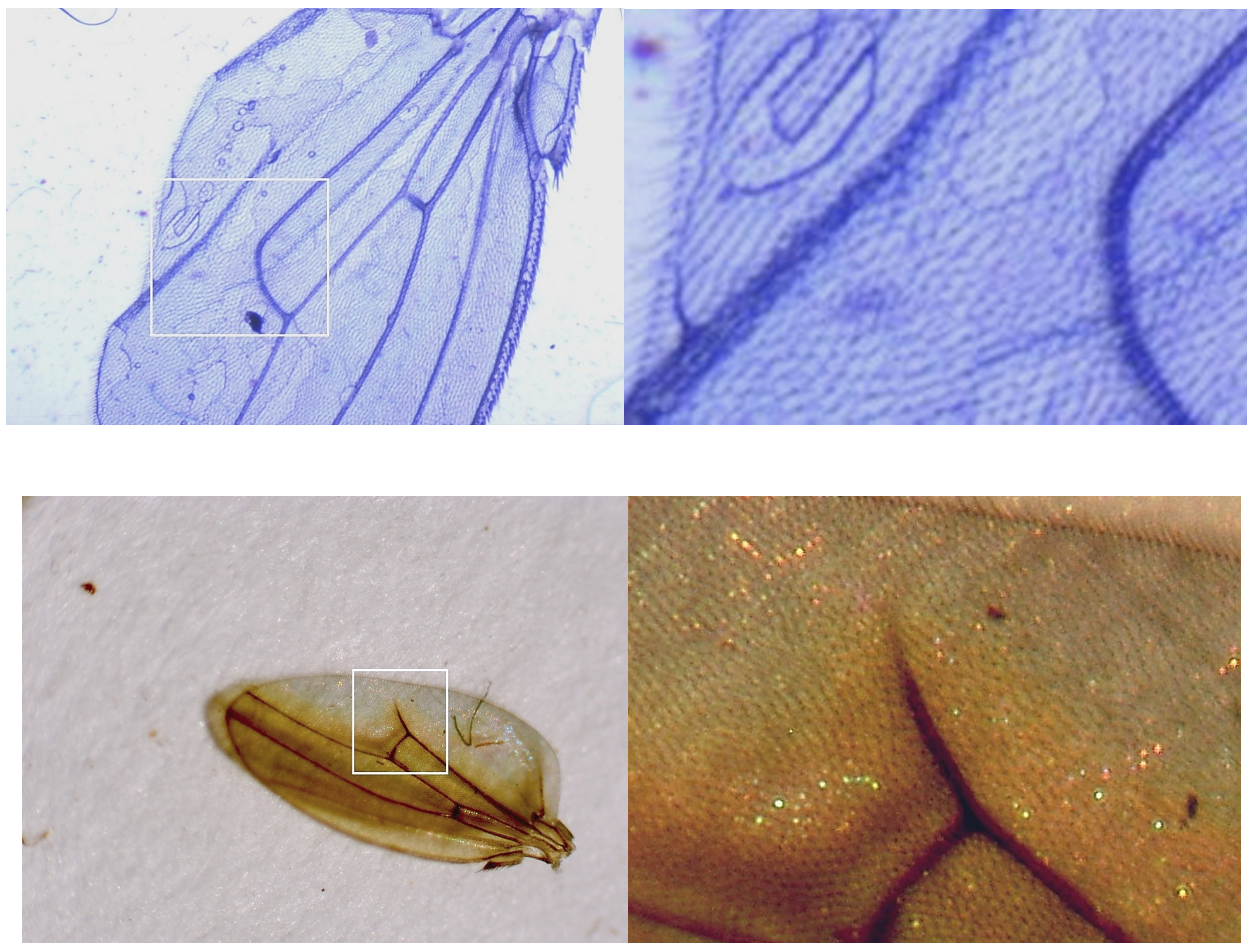
Es una anomalía prácticamente ubicua: en todas las líneas estudiadas que portaban material genético ajeno han aparecido alguna deformación alar

Venación alar incompleta

Aunque hemos encontrado distinta tipología alar general, la vena longitudinal L5 desde la intersección con vena posterior cruzada es la única que presentó un desarrollo incompleto. Se resaltan tres características:

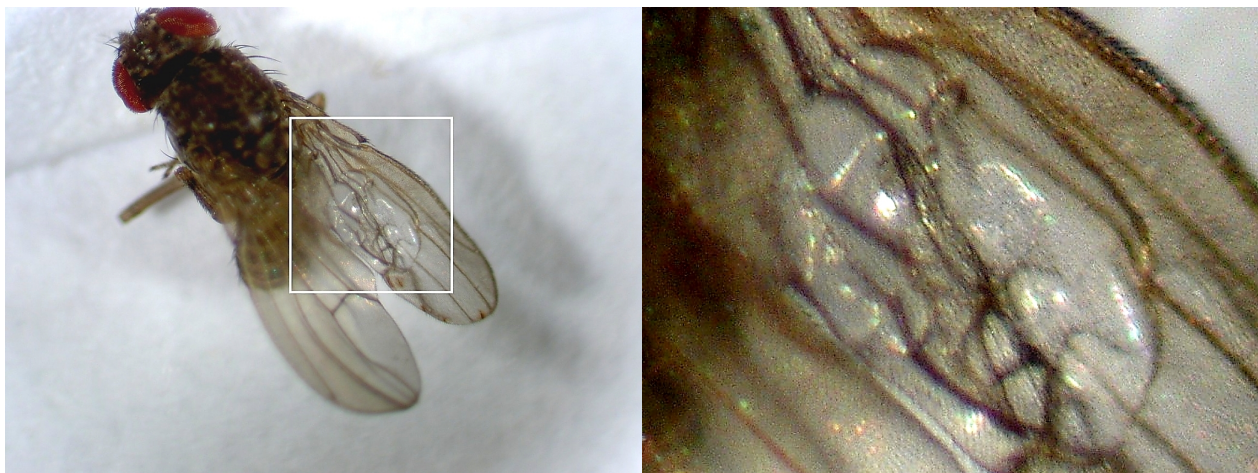
1. Se asoció con una proporción muy alta a una determinada organización genética, concretamente a la línea de letales *pseudoequilibrados* correspondiente al fragmento 4 B3-C2.,

2. La asociación genética no fue exclusiva. La hemos encontrado en otras líneas, pero con una proporción muy pequeña, similar a la del resto de las deformidades.
3. Es una anomalía que presenta una gradación muy clara, tanto en el caso 1. como en la 2., que va desde la desaparición completa (primera foto) de la vena desde la intersección, hasta la práctica normalidad, con todas las posibilidades intermedios (siguiente fotografía)



Alas vesiculadas

Este caso presenta una evolución que también podemos seguir durante el desarrollo. Dado que el imago emerge de la pupa con las alas plegadas y luego las despliega, una observación atenta de las primeras etapas nos permitió describirla. Aunque presenta variabilidad, lo más común es que aparezcan ampollas turgentes al desarrollar una o ambas alas. Tras el total desplegado y en un espacio relativamente corto de tiempo (de unos minutos a una hora) la turgencia desaparece y el ala queda en el estado que muestran las siguientes fotografías



Alas no desplegadas

No se produce el desplegado tanto en una como en ambas alas tras la emergencia de la pupa. Las fotos que se adjuntan podrían parecer recién emergidos por sus alas, pero son de adultos de varios días de edad (obsérvese la coloración).



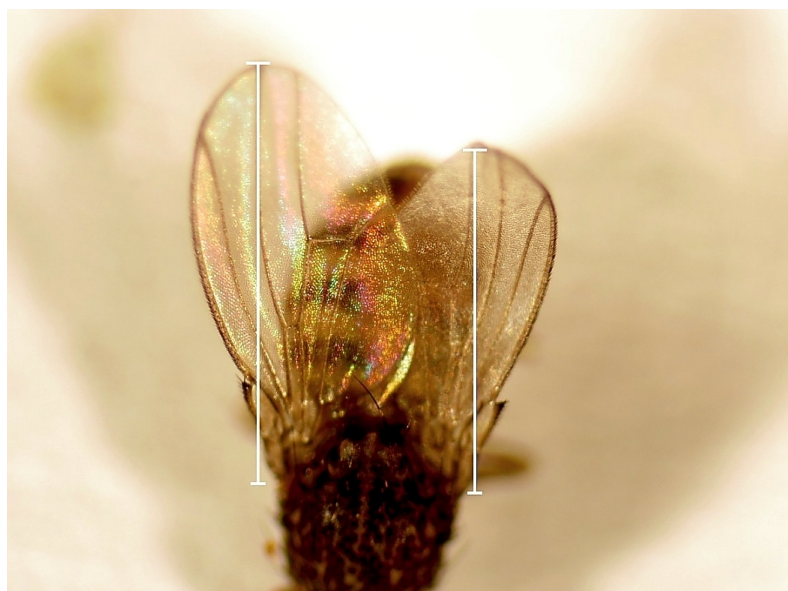
Alas curvadas

La velocidad con la que las *Drosophila* despliegan sus alas no nos permite discriminar si este fenotipo es en realidad una forma menos grave del anterior. Sin embargo, lo comentamos aparte por su evidente diferencia morfológica y por que lo hemos utilizado como marcador intentando lograr una línea que lo exprese en todos los individuos a partir de la 4 C2-C3. La razón de esta elección fue su similitud con mutaciones conocidas como *curly* o *curved* y que sus portadores si son fértiles



Alas acortadas

También podría ser un caso menos grave de los fenotipos descritos anteriormente, sobre todo si consideramos que el acortamiento del ala está asociado a una ligera curvatura que podría ser debido a un defecto en el desplegamiento.

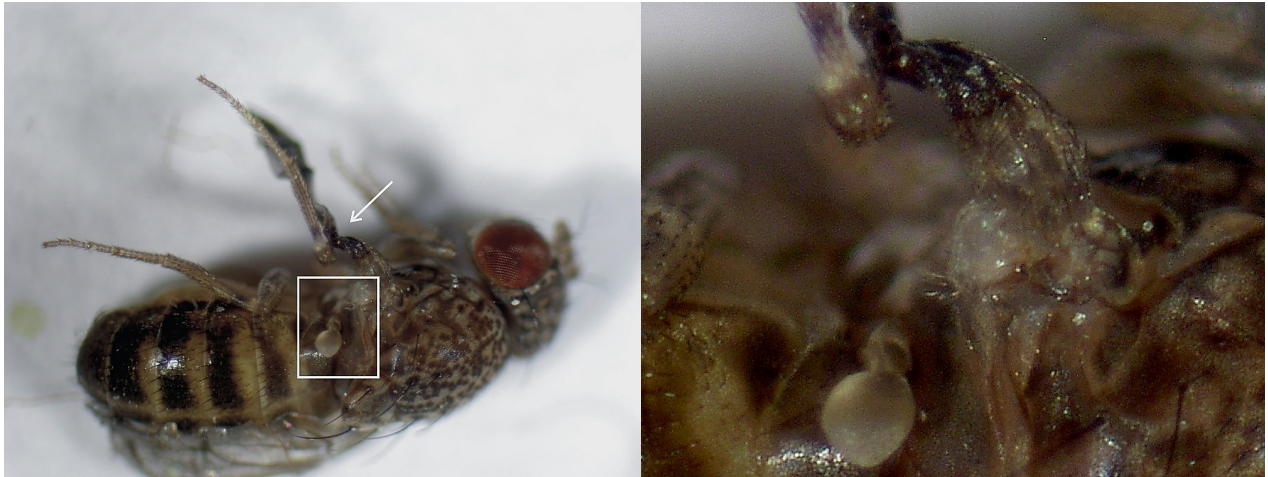


Resultados

Su apariencia es similar a la mutación *miniature*, pero en una sola mitad del cuerpo

Sin ala

Este caso es un fenotipo extremo en el que ya no existe ni siquiera rudimento del ala, en este caso en una mitad del cuerpo. El balancín de ese lado se mantiene normal pero una de las patas está deformada, fenotipo que no hemos observado en ningún otro individuo



Cabeza

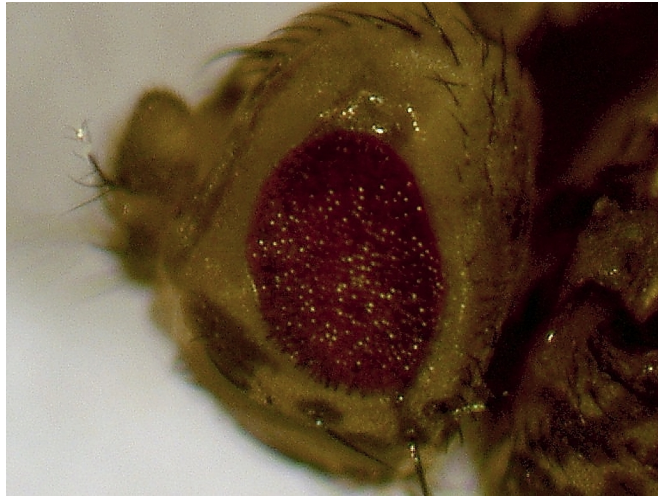
Ojos de distinto tamaño

El título y las fotos son suficientemente descriptivos. De todas maneras señalar cuatro puntos:



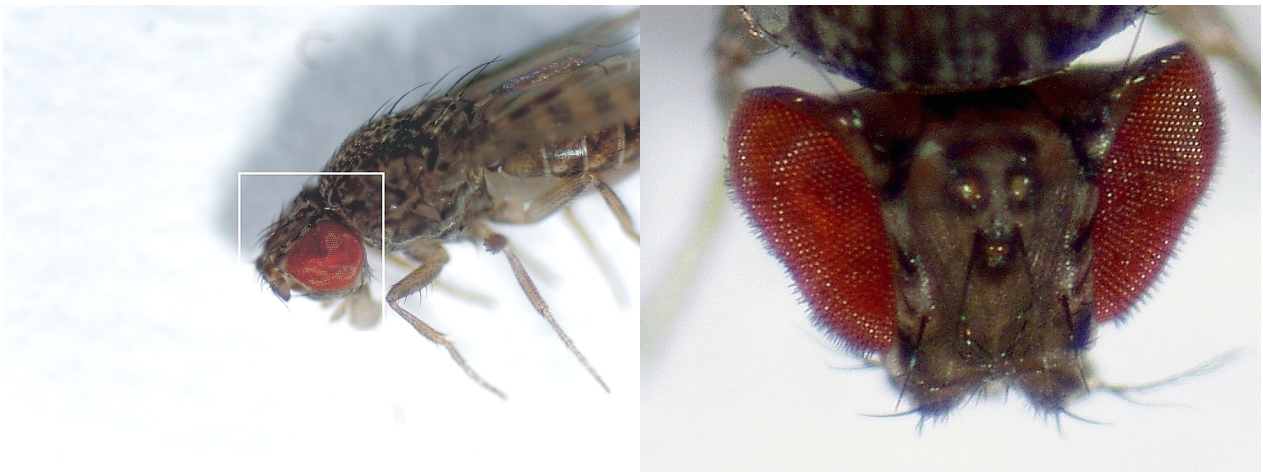
- Es una anomalía extraordinariamente rara. Sólo ha aparecido en un individuo de los miles analizados
- El individuo presentaba otras deformaciones como la falta de desplegamiento alar

- c) Pese a que el ojo no está desarrollado, el tejido subyacente donde se apoya parece totalmente normal



Cabeza mal desarrollada

Se acompaña también de una falta de turgencia en los dos ojos



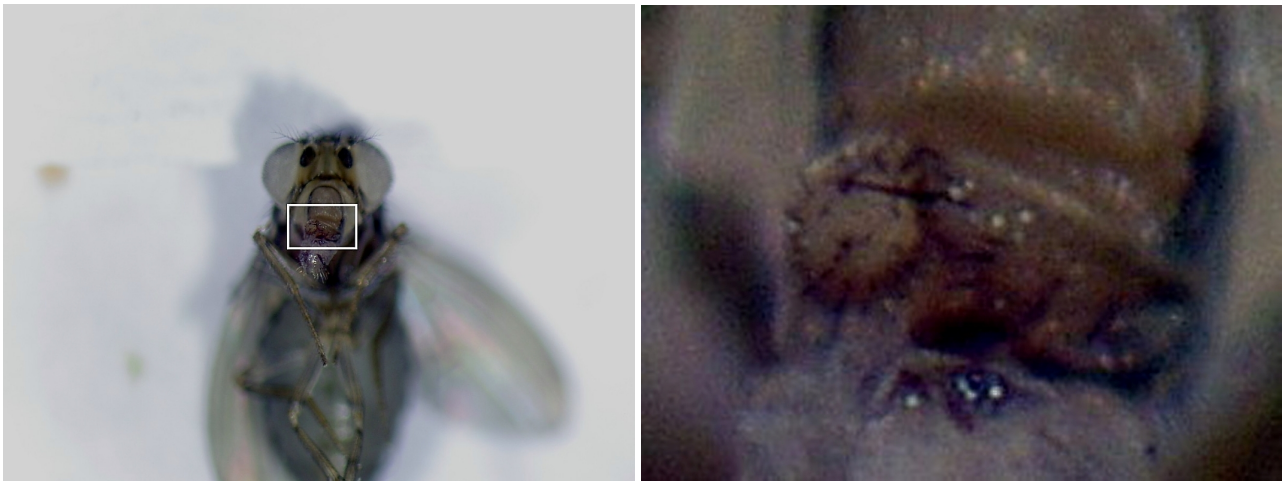
Antenna fundida

Se trata de una fusión de la región terminal de la antena. Aunque la fotografía proviene de una *Drosophila* con graves deformaciones generales, se ha observado este fenotipo en moscas en apariencia normales, que presentaban sólo esa característica.



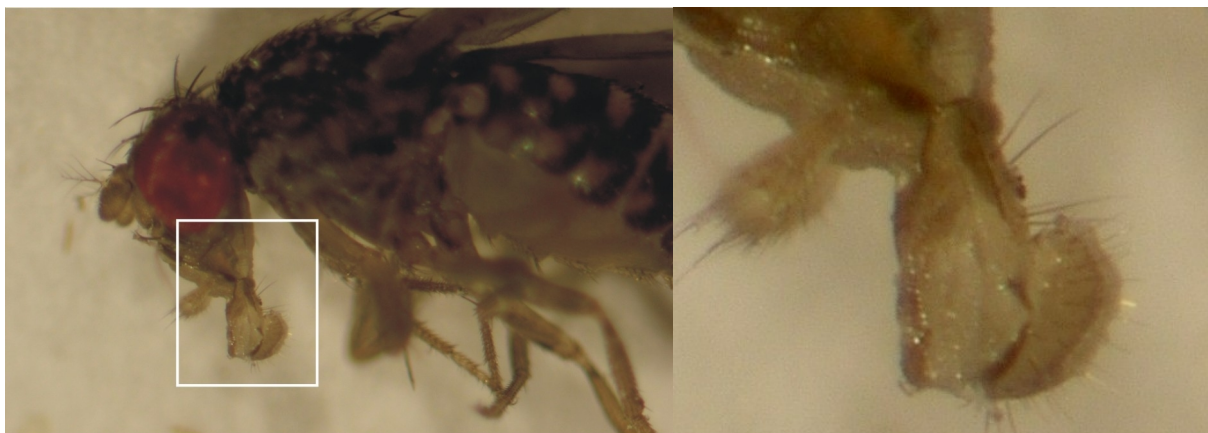
Palpos de la trompa fundidos

La calidad de la fotografía no permite apreciarlo totalmente, pero la observación directa si determina que es una fusión terminal de los palpos, no producida por una circunstancia externa.



Trompa no retractil

Esta es una deformación difícil de mostrar sólo con una fotografía porque su diferencia morfológica respecto a una *Drosophila* normal es sutil: obsérvese que el último segmento de la trompa esta ligeramente agrandado. La consecuencia es una imposibilidad de retraer la trompa, es decir que la posición mostrada es permanente en este individuo.



Deformaciones generales

Como ya ha quedado de manifiesto en algún caso, las deformaciones hasta aquí descritas no son excluyentes. Es relativamente frecuente que los casos más severos de cada una de ellas se vean acompañados de alteraciones en otras partes de su cuerpo.



En algún caso, más bien raro, la *Drosophila* presenta una anomalía general en su evolución combinando deformaciones en prácticamente todo su cuerpo. Aunque resulta insólito, estas moscas permanecían vivas durante varios días, pero nunca con una longevidad normal. Tampoco dejaron descendencia, como era esperable

Asignación

Alteración	cruces (x)			
	Homocigoto	Heterocigoto	Let.pseudoe.	retrocruce
Abdomen mal segmentado	A1 x A1 A4-B3(I) x A4-B3(I) A4-B3(II) x A4-B3(II) C2-C3 x C2-C3 E1-E5(w) x E1-E5(w)	A1 x A4-B3(I) A1 x A4-B3(II) A1 x D1-D5 A1 x E1-E5(w) A4-B3(I) x A1 A4-B3(I) x A4-B3(II) A4-B3(I) x E1-E5(w) A4-B3(II) x A1 A4-B3(II) x A4-B3(I) C2-C3 x A4-B3(I) C2-C3 x E1-E5(w) E1-E5(w) x A4-B3(I) E1-E5(w) x A4-B3(II)	G1-G3 G3-G5	Bw x A1
Genitalia separada del último segmento			B3-C2	
Sin genitalia externa	A4-B3(I) x A4-B3(I) A4-B3(II) x A4-B3(II)	A1 x D1-D5 A1 x E1-E5(W)		
Genitalia rotada	A1 x A1 A4-B3(I) x A4-B3(I) A4-B3(II) x A4-B3(II) E1-E5(W) x E1-E5(W)	A1 x A4-B3(I) C2-C3 x A4-B3(I) C2-C3 x D1-D5		A4-B3(II) x Bw
Venación alar incompleta		C2-C3 x E1-E5(w) E1-E5(w) x A4-B3(II)	B3-C2	
Venación incompleta, abdomen mal segmentado		E1-E5(w) x A4-B3(I)		
Alas deformadas	A1 x A1 A4-B3(I) x A4-B3(I) A4-B3(II) x A4-B3(II) C2-C3 x C2-C3 D1-D5 x D1-D5 E1-E5(w) x E1-E5(w)	A1 x A4-B3(I) A4-B3(I) x A4-B3(II) C2-C3 x A4-B3(I) C2-C3 x E1-E5(w) E1-E5(w) x A4-B3(II) F1-H	B3-C2 G1-G3 G3-G5	
Sin ala, pero con balancín, pata alterada		A1 x D1-D5		
Un ojo reducido + alas no desplegadas		E1-E5(w)x A4-B3(II)		

Cabeza mal desarrollada	A4-B3(II) x A4-B3(II)	
Antenna fundida	A1 x A1	
Palpos fundidos	E1-E5(w) x E1-E5(w)	
Deformación extrema	A4-B3(I) x A4-B3(I)	A1 x E1-E5(w) E1-E5(w) x A1
pata torcida, mala segmentación abdominalretraso de desarrollo en una mitad del cuerpo		A1 x Bw

Fijación

La mayoría de las anormalidades encontradas se asociaron a una esterilidad de hecho de causa evidente, sin embargo alguna de las deformaciones si proporcionaron descendencia viable. Escogimos por su fácil diagnóstico la malformación de alas curvadas hacia arriba con una morfología que podría recordar a los mutantes *curved* o *curly*.

La hipótesis a contrastar es que al menos esta deformación está producida por la mutación, alteración o modificación de una zona génica del ADN que se comportará mendelianamente y que se podrá fijar en una línea que lo exprese en todos sus individuos o, en el caso de letalidad, en los heterocigotos.

En la tabla siguiente se muestran las pruebas realizadas. Se partió de una línea 4C2-C3 y se cruzaron individuos por parejas. Todos los individuos de la descendencia que mostraban alas curvadas fueron probados entre si o con sus hermanos. A partir de la tercera generación el número de descendientes disminuye y dejan de aparecer alas curvadas. Aún así se siguieron cruzando hermano por hermano hasta la sexta generación.

LÍNEA 4C2-C3

		nº de cruces			
		1ª generación	2ª generación	3ª generación	4ª generación y ss.
alas curvadas	alas curvadas	6	2	1	0
salvaje ⁴	salvaje	12		2	20
salvaje	alas curvadas	2	4	3	
alas curvadas	salvaje	1	10	3	
		21	16	9	20
Descendientes con alas curvadas		18	8	0	0

⁴ La denominación "salvaje" en este caso se refiere a *Drosophila* con alas normales, pero hermanas de las que presentan deformaciones en cada una de las generaciones

Esperaríamos la aparición progresiva de un mayor número de individuos con la característica seleccionada hasta la totalidad o de una estabilización en torno al 50% en el caso de algún grado de letalidad. Sin embargo es evidente que esto no ocurre.

Con los datos anteriores debemos rechazar la hipótesis inicial planteada, por lo tanto no hemos podido fijar la deformación en una línea que la exprese de manera predecible. Probablemente no se comportará de manera mendeliana.

No se ha repetido este experimento con las otras líneas ni deformaciones encontradas pero los datos de cuantificación reflejan un comportamiento similar a esta, por lo que no hay en principio razones para pensar en una base genética distinta.

Cuantificación

Durante todo este trabajo cualquier anomalía observada en el desarrollo fue anotada, descrita y fotografiada, pero lógicamente no fueron contadas todas las *Drosophila* para poder establecer relaciones. Los datos mostrados a continuación corresponden a un estudio específico y por eso no se ven reflejadas todas las alteraciones anteriormente descritas pero que no aparecieron aquí. Se realizó a temperatura controlada en la cámara de cría (23°C)

ESPECIES DE REFERENCIA

	<u>individuos</u> <u>alterados</u>	<u>Total</u>
<i>D. buzzatii</i> SL 6	0	250
<i>D. koepferae</i> SL 8	0	250

HOMOCIGOTOS (1282 individuos analizados)

	♂♂	♀♀	Σ	%
<i>Abdomen deformado</i>	10	12	22	1,72
<i>Alteraciones del ala</i>	8	8	16	1,25
<i>Genitalia alterada</i>	1		1	0,08
<i>Palpos fundidos</i>		1	1	0,08
Total	19	21	40	3,12

HETEROZIGOTOS DOBLES (2248 individuos)

	♂♂	♀♀	Σ	%
<i>Abdomen deformado</i>	18	17	35	1,56
<i>Alteraciones del ala</i>	16	8	24	1,07
<i>Genitalia alterada</i>	4		4	0,18
<i>Ojo reducido</i>		1	1	0,04
<i>Trompa fundida</i>		1	1	0,04
Total	35	24	59	2,62

HETEROZIGOTOS SIMPLES (2657 individuos)

	♂♂-♀♀	Σ	%
<i>Abdomen deformado</i>	2	2	0,08
<i>Alteraciones del ala</i>	1	1	0,04
<i>Genitalia alterada</i>	3	3	0,11
<i>Deformación lateral</i>	1	1	0,04
Total	7	7	0,26

Resulta evidente que los defectos en el desarrollo más frecuentes son las alteraciones en la simetría del abdomen en cualquiera de sus grados, seguido de alteraciones en las alas, ya sean de tamaño, forma o venación

Tras estos resultados contrastamos las siguientes hipótesis

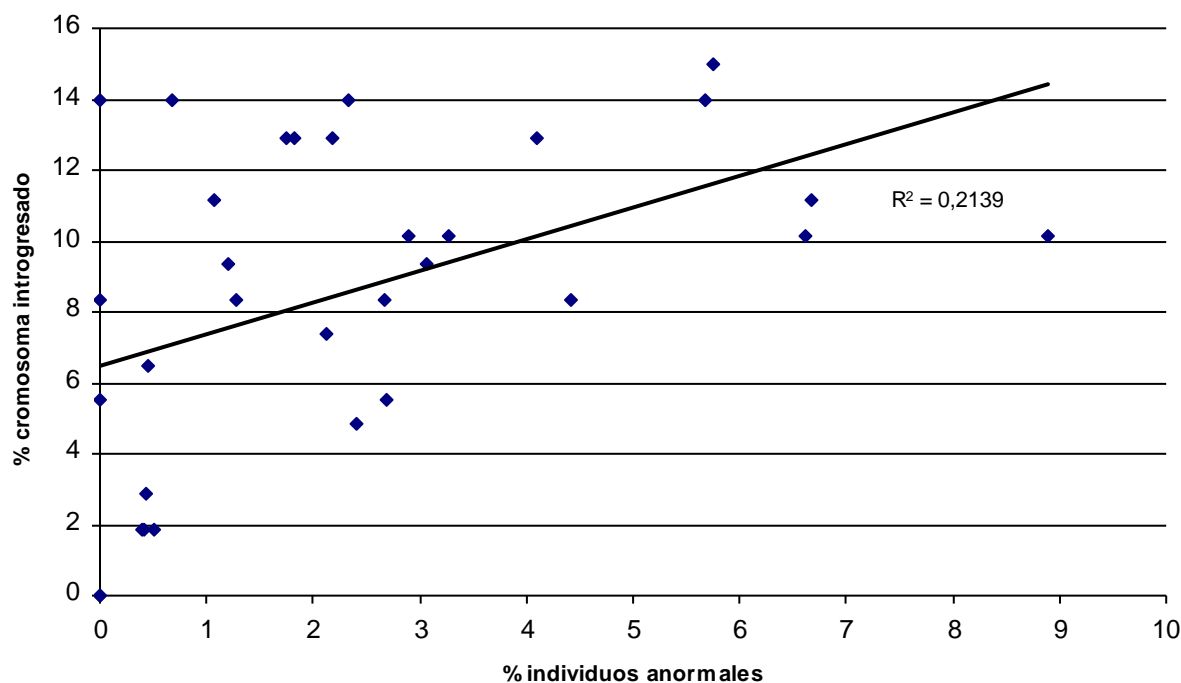
H₀: Las alteraciones del desarrollo son equivalentes en las poblaciones salvajes respecto a las que llevan introgresión de un fragmento ajeno.

Comprobamos la hipótesis con una χ^2 de homogeneidad comparando los datos de las poblaciones de las dos especies de referencia respecto a la suma total de resultados de cualquier cruce con introgresión. La probabilidad asociada a la hipótesis nula es $P=0.002$, por lo que la rechazamos y adoptamos la hipótesis alternativa con un nivel de confianza del 99%.

Podemos afirmar, por tanto, que la presencia de algún material introgresado de una especie en otra favorece la aparición de deformaciones en el desarrollo. Es más, considerando que los resultados en las especies de referencia son nulos podemos especular que el aporte genético ajeno es una de las causas que las provocan.

H₀: El tamaño de la introgresión y el número de individuos alterados están relacionados

Realizamos un diagrama de dispersión que relaciona el porcentaje de cromosoma introgresado respecto a la proporción de individuos con alteraciones del desarrollo



Se puede observar una cierta tendencia, por lo que comprobamos la relación entre las variables utilizando un coeficiente de correlación lineal. Este estadístico calcula un valor de $r=0.4624$, mayor que $r(29,0.01)=0.456$ que devuelven las tablas, por lo que podemos aceptar la hipótesis nula con un nivel de significación de incluso un 0.01, altamente significativo. De todas maneras, el cuadrado del coeficiente nos explica que el 21% de la variabilidad dentro de los individuos anormales se debe al cromosoma introgresado.

Podemos afirmar que la cantidad de material introgresado está correlacionado directamente con la aparición de alteraciones del desarrollo, es un factor para ello y que un mayor aporte produce un mayor efecto en estos fenotipos.

H₀: El porcentaje de individuos con alteración del desarrollo es asimilable en las distintas arquitecturas genéticas

Categorizamos los tres grupos que venimos considerando en todo este trabajo, es decir, *Drosophilas* con material de *D. koepferae* en homocigosis, en heterocigosis doble *trans* y en heterocigosis simple.

Comprobaremos esta afirmación mediante un contraste de igualdad de medias. Acreditamos en primer lugar las condiciones básicas de normalidad e igualdad de varianzas. El resultado conduce a afirmar que aunque los datos siguen una distribución normal (Valor $P=0.592$ en la prueba de Kolmogorov-Smirnov), debemos rechazar la igualdad de varianzas con un nivel de significación del 0,05 (test de Levene con valor P correspondiente de 0.037). Unido esto a la diferencia de tamaño muestral en cada categoría nos hace inclinarnos por el test de Kruskal-Wallis. Esta prueba da un valor de 7,136 para nuestros datos y una probabilidad asociada de 0.026. Rechazamos entonces la hipótesis con un nivel de significación de 0.05.

Tras este resultado nos interesaría saber cuáles son los grupos que producen esta diferencia. Aplicamos un test post hoc de Games-Howell para varianzas distintas y obtenemos:

		Probabilidad asociada
Homocigotos	Heterocigotos dobles	ns
Homocigotos	Heterocigotos simples	*
Heterocigotos dobles	Heterocigotos simples	***

*** = $P < 0,001$ ** = $P < 0,01$ * = $P < 0,05$ (significación estandar) / ns=no significativo

Los resultados nos llevan a una conclusión aparentemente contradictoria: la arquitectura genética influye en la aparición de alteraciones pero las diferencias se dan entre los heterocigotos simples respecto a los demás. Podría pensarse *a priori* que estas divergencias deberían darse entre heterocigotos dobles y homocigotos (su arquitectura genética es más divergente) pero no es así. La explicación la podemos encontrar asociando este resultado al del apartado anterior y considerando que los heterocigotos simples tienen una cantidad de material genético ajeno más pequeño, y que sin embargo este es asimilable entre los otros grupos.

Podemos afirmar, por tanto, que las diferencias observadas en los distintos grupos se deben más a la cantidad de material de la especie donante, mayor o menor, que a la disposición genética en homocigosis o no de este material.

¿Las condiciones ambientales influyen en la proporción de deformaciones?

H₀: El porcentaje de individuos con alteración del desarrollo es asimilable en las distintas condiciones ambientales

Se realizó un recuento similar a los anteriores utilizando las líneas homocigotas que se mantienen en el ambiente del laboratorio, en condiciones ambientales más variables. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

HOMOCIGOTOS (902 individuos analizados)				
	♂♂	♀♀	Σ	%
Abdomen deformado	4	0	4	0,44
Alteraciones del ala	5	4	9	1,00
Genitalia alterada	1	0	1	0,11
Deformación general	1	0	1	0,11
Antenna fundida		1	1	0,11
Total	11	5	16	1,77

Se compararon estos datos con sus equivalentes de la cámara de cría (página 168) y se contrastó la hipótesis mediante una chi-cuadrado de homogeneidad entre muestras. La probabilidad asociada a los datos es de $P=0'05000$, por lo que con un el nivel de significación que utilizamos habitualmente no podemos ni negar ni afirmar la homogeneidad entre poblaciones.

En cualquier caso esa duda nos permite especular con la posibilidad de una influencia ambiental en el proceso, lo que nos animó, junto con los experimentos de Macías(2004) a hacer un test de temperatura heat-shock. Los resultados de individuos alterados en la descendencia son los siguientes:

HOMOCIGOTOS (1452 individuos analizados)				
30°C a 23°C				
	♂♂	♀♀	Σ	%
<i>Abdomen deformado</i>	9	3	12	0,83
<i>Alteraciones del ala</i>	15	19	34	2,34
<i>Genitalia alterada</i>	4	0	4	0,28
<i>Cabeza malformada</i>	1	0	1	0,07
<i>Trompa fundida</i>		1	1	0,07
Total	29	23	52	3,58

Control *D. buzzatii* 0 de 1032 individuos

23°C a 30°C				
	♂♂	♀♀	Σ	%
<i>Alteraciones del ala</i>	6	3	9	4,62
Control <i>D. buzzatii</i>	0 de 130 individuos			

Resulta relevante señalar que los en los recuentos de las especies salvajes de referencia siguieron sin aparecer individuos malformados, reforzando todavía más el origen genético de estas alteraciones

Se contrasta:

H₀: El distinto grado de exposición a temperaturas restrictivas es irrelevante en el porcentaje de individuos con alteración del desarrollo

Contrastamos mediante una chi-cuadrado de homogeneidad los datos anteriores. La probabilidad asociada no es significativa por lo que aceptamos la hipótesis nula. Ambas series de comportan de igual manera

H₀: El porcentaje de individuos con alteración del desarrollo es equivalente frente a temperaturas controlada o restrictiva

Utilizamos para ello los datos de la tabla de homocigotos de la página 168 y los comparamos mediante una nueva chi-cuadrado de homogeneidad con los anteriores, se reitera la aceptación de la hipótesis con un nivel de confianza del 95%

Letales pseudoequilibrados

Comentario aparte merecen estas líneas. Se realizaron también recuentos en ellas, pero dada su falta de homogeneidad genética no se incluyen en las hipótesis contrastadas anteriormente.

4G1-G3 (457 individuos analizados)				
	♂♂	♀♀	Σ	%
<i>Abdomen deformado</i>	4	2	6	1,31
<i>Alteraciones del ala</i>	3		3	0,66
Total	7	2	9	1,97

4G3-G5 (126 individuos analizados)				
	♂♂	♀♀	Σ	%
<i>Abdomen deformado</i>	3	2	5	3,97
<i>Alteraciones del ala</i>	1		1	0,79
Total	4	2	6	4,76

4B3-C2 (157 individuos analizados)				
	♂♂	♀♀	Σ	%
<i>Genitalia alterada</i>	1		1	0,64
<i>Alteraciones del ala</i>	2		2	1,27
	3	0	3	1.91

Aunque no sea riguroso incluirlas en los análisis estadísticos generales, se observan intuitivamente las mismas tendencias: las introgresiones producen alteraciones en una baja proporción, siendo las más frecuentes las de alas y abdomen, y no aparecen asociadas aun fragmento concreto.

Fragmento 4B3-C2

Lo anteriormente expuesto choca frontalmente con los datos de esta cepa respecto a la venación incompleta de la vena longitudinal L5 a partir de la intersección con la vena posterior cruzada. Se puede observar en el cuadro en rojo la proporción de más del 50% que alcanza este fenotipo en esta línea.

4B3-C2 (329 individuos analizados)				
	♂♂	♀♀	Σ	%
<i>Venación incompleta</i>	112	60	172	52,28
<i>Total individuos</i>	196	133		

Apoyándonos en la ausencia de ordenación 4s/s y en que las otras líneas letales *pseudoequilibradas* no presentan este comportamiento pese a llevar la misma arquitectura genética, podríamos afirmar que este fragmento se asocia al desarrollo deficiente de la vena alar L5. La distinta intensidad del efecto sumado a su proporción indicaría una penetrancia incompleta del efecto

Contrastamos estos datos con los correspondientes de machos y hembras con la anormalidad de la vena alar mediante una chi cuadrado de homogeneidad. El resultado de probabilidad del suceso es $P=0.187$, por lo que podemos afirmar con un nivel de significación $\alpha=0.005$ que se comportan en ratio sexual de manera similar y que la alteración de la vena L5 no influye en el desequilibrio de la ratio sexual.

Resumen de resultados del apartado

1. La presencia de fragmentos cromosómicos de *Drosophila koepferae* en *Drosophila buzzatii* produce un porcentaje, pequeño pero estable, de individuos con alteraciones en el desarrollo.
2. La cantidad de genoma ajeno está directamente relacionado con el porcentaje de malformados, pero no así su posición en homocigosis o heterocigosis doble *trans*
3. Las deformaciones no están asociadas a un fragmento cromosómico concreto, excepto la venación incompleta del ala en la localización 4B3-C2, con la salvedad de que esta anomalía no es exclusiva de este fragmento.
4. Las condiciones ambientales pueden influir en la viabilidad de los individuos, pero no alteran sustancialmente la aparición de deformaciones físicas. Esto soportaría una base mayormente genética del fenómeno.
5. No resulta posible la fijación en una cepa independiente de las alteraciones citadas, a diferencia de las mutaciones convencionales.

DISCUSIÓN

El estudio genético de la especiación mediante el uso de experimentos de hibridación entre especies gemelas o similares es un recurso científico que podemos considerar clásico. Sin embargo la posibilidad de obtención de líneas con una sustitución total de fragmentos completos de material genético de una especie en otra, con aportación genética externa en contenido y localización precisa y que se perpetúa en el tiempo no ha sido frecuentemente abordado.

Este es el planteamiento que este trabajo aporta como novedoso: la creación de líneas de *Drosophila* transgénicas, pues aunque esta denominación no se aplica a los híbridos entre especies nuestros individuos homocigotos para la introgresión lo son en sentido estricto, aunque con diferencias respecto a otros organismos de este tipo obtenidos por manipulación molecular con los que habitualmente se investiga por la existencia de:

- 1) una sustitución, no una adición
- 2) una aportación genética de la especie donante comparativamente enorme, al tratarse de cromosomas frente a genes o pequeñas regiones de ADN en los transgénicos habituales
- 3) una sustitución de un fragmento de cromosoma en ambos homólogos, con sus implicaciones génicas, estructurales y de cualquier otro tipo, imposibles de analizar en una inclusión de un pequeño fragmento de ADN
- 4) su obtención por medio de cruzamiento naturales dirigidos con técnicas de selección artificial

Este acercamiento proporciona tres aspectos difíciles de encontrar en otros estudios: magnitud, estabilidad y flexibilidad. Magnitud por la zona estudiada, que comprende un cromosoma entero y por el tamaño de las introgresiones de material ajeno, que llega hasta un 15% de un cromosoma (sobre un 4% del genoma) en un solo segmento. Estabilidad porque las líneas constituidas en homocigosis persisten y permiten cualquier tipo de acercamiento experimental sin limitaciones temporales, habilitando diversidad de comprobaciones destinadas a desentrañar los factores reales que se dan en estos procesos. Flexibilidad por los diferentes tamaños de material ajeno y por la capacidad de construir distintas arquitecturas genéticas con permanente repetibilidad y reproducibilidad

Al poder abarcar todo un cromosoma que representa aproximadamente un veinte por ciento del genoma los sucesivos experimentos dejan al descubierto mecanismos tanto génicos como de otra naturaleza, permitiéndonos aventurarnos en el complejo mundo de las interacciones entre zonas cromosómicas *in vivo*. Los resultados son obtenidos sobre individuos vivos a los que se han controlado en distintas fases del desarrollo y lo relacionamos con efectos descubiertos por técnicas moleculares por otros autores, permitiendo complementarlos y dirigirlos desde una visión de conjunto.

Hay muchas preguntas que se han planteado en estudios de este tipo. Entre ellas ¿cuántas regiones genómicas se diferencian durante la especiación? ¿Cómo de pequeñas son las regiones que divergen significativamente? ¿Son dominantes o recesivas? ¿Qué efecto tienen sobre la *fitness* del individuo? ¿Cómo están distribuidas las regiones de excepcional divergencia por el genoma? (Presgraves, 2003; Abott, 2013). Nuestro objetivo es avanzar en la respuesta parcial de alguna de ellas, como en la distribución de diferencias, su carácter recesivo o dominante y sus relaciones básicas, midiéndolas por sus efectos sobre la *fitness* de los individuos completos en aspectos tan básicos como esterilidad, inviabilidad y desarrollo.

El aislamiento precigótico entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*

Probablemente el primer tema de discusión deba ser la autentica separación específica con respecto a la interrupción de su flujo génico en la naturaleza. Aunque existen trabajos que especulan sobre su existencia de modo natural (Gómez, 2003; Piccinali, 2004) estos se basan en hipótesis interpretativas respecto a la existencia de polimorfismos específicos compartidos. El cruzamiento es posible en condiciones ideales de laboratorio como demuestra este mismo estudio, junto con otros muchos (Naveira, 1991; Carvajal, 1996; Morán, 2014) pero la obtención de híbridos entre estas especies es complicada. El porcentaje de éxito en el cruce varía según qué investigación se consulte y va desde la inexistencia (Machado, 2006) a la bajísima proporción de un 0'5% de nuestros datos, a efectividades relativamente altas de hasta 25% de los cruces (Soto, 2007). Es difícil interpretar estas diferencias pero hay datos que observan divergencias en la morfología de los órganos sexuales de *D. buzzatii* dependiendo de alimentación, tamaño o simpatria o alopatría con *D. koepferae* (Soto, 2007; Soto, 2012) y también diferentes patrones reproductivos e incluso falta de cruzamiento dentro de las poblaciones de esta última especie explicables por periodos largos de aislamiento entre poblaciones, cuellos de botella o deriva genética. (Fanara, 1999; Machado, 2006). Estas diferencias llegan a nivel genético en las poblaciones de esta especie, especialmente al sur del Chaco (Piccinali, 2004)

Nuestros datos confirman el aislamiento precigótico y añaden un comportamiento sexual distinto dentro de cada especie, ya observado en otros trabajos que también estudian el proceso copulatorio entre ellas, y que obtienen una baja proporción de machos que en cruces masales cortejan a las hembras. (Machado, 2002)

La secuencia copulatoria incluye estímulos visuales, sonoros, gustatorios y olfativos (Oliveira, 2011; Jennings, 2013). Notamos que los machos de *D. buzzatii* intentan inmediata y permanentemente la cópula con hembras, ya sea en cruces individuales o masales, independientemente de que la especie sea la misma o la ajena, mientras que los machos de *D. koepferae* no tienen primariamente ninguna reacción en cruces individuales, pero si en masales. Este comportamiento diferencial indicaría una diferencia interespecífica en el origen principal de la estimulación sexual por parte de las hembras y machos: en el caso de *D. buzzatii* el origen principal podría ser de tipos visual como prueba la inmediatez del intento de cópula; en el caso de *D. koepferae* la estimulación principal sería resultado de la acción o la cantidad de feromonas que actuarían sobre el macho y que se vería potenciada por la presencia de un número más elevado de hembras.

La base de esta interpretación serían los datos obtenidos en *D. koepferae* sobre el retardo en la cópula en cruces individuales frente a la mayor efectividad en los masales y los movimientos en las alas de las hembras. También podemos apoyarnos en los estudios sobre los hidrocarburos cuticulares que actúan como feromonas y que son altamente variables entre especies, entre poblaciones y entre sexos de *Drosophila* (Jennings, 2013; Oliveira, 2014).

En *Drosophila melanogaster* y *D. simulans* y entre poblaciones americanas y europeas de *D. montana* se observan diferencias que se traducen en discriminación en el comienzo de la cópula. Aunque la estimulación proviene de la forma del abdomen (Orr, 1995), también es determinante la secreción abdominal de feromonas cuyas diferencias de composición interespecíficas son de origen genético y condicionan la estimulación del macho hacia la hembra (Orr, 1995; Jennings, 2013; Oliveira, 2014). En *D. virilis* a mayor cantidad de hormona producida más rápidamente se orienta el macho hacia la hembra y comienza el cortejo (Jennings, 2013). La rápida evolución divergente en la composición de estos hidrocarburos cuando se situa

en simpatria *D. birchii* con *D. serrata* demuestra una fuerte presión selectiva por la importancia de estas sustancias como condicionante del reconocimiento sexual y consecuente fuente de aislamiento reproductivo, incluso en estadios iniciales de este proceso (Higgie, 2000; Jennings, 2013). Aunque Oliveira encuentra en las especies del complejo *buzzatii* un patrón de conservación en los hidrocarburos cuticulares mayor que en el canto, por su proceso más complejo de síntesis (Oliveira, 2011), las diferencias en el ritmo de evolución de las feromonas le permiten construir una filogenia del grupo y sus propios datos muestran diferencias de composición entre las dos *Drosophila* de nuestro estudio

Dos grupos de resultados más nos aportan el grado de aislamiento precigótico. Uno es la distribución de cópulas en el tiempo, que señalan diferencias significativas de comportamiento interespecífico en el comienzo de la cópula. Otro es la duración del acoplamiento, significativamente distinto y que podría indicar o bien una distinta mecánica (no olvidemos que el *aedeagus* es diferente (Soto, 2012), una distinta transferencia de material o ambas cosas. Resulta curioso en este apartado que los datos heterogéneos obtenidos sobre mecánica copulatoria dentro *D. koepferae* coincida con datos moleculares de heterogeneidad poblacional dentro de esta especie (Piccinali, 2004).

Independientemente de cómo sean explicadas estas diferencias nos permiten concluir que la dificultad que hemos encontrado en obtener híbridos de estas especies parte de procesos precopulatorios muy distintos, es decir: ambas especies presentan un aislamiento precigótico elevado. No existen dudas sobre el aislamiento reproductivo y ecológico de estas dos especies en la naturaleza.

De este aislamiento precisamente surge un tema a discusión. ¿Son idóneas para el estudio de la especiación dos especies que han divergido desde hace 4-5 millones de años (Gómez, 2003; Manfrin, 2006; Soto, 2007; Oliveira, 2012; Fontdevilla, 2014; Morán, 2014) y que se mantienen con flujo génico nulo?

Existen dos planteamientos en el estudio de la especiación: usar especies modelo de las que se conocen muchas características y estudiar fenotipos estandarizados como fertilidad o inviabilidad, con la incertidumbre de si son realmente representativas de los ocurre en la naturaleza, o estudiar poblaciones naturales que hibridan normalmente y que pueden no ser representativas del proceso de especiación (Noor, 2006)

Para resolver la cuestión creemos que en primer lugar hay que señalar que la progresiva interrupción de flujo génico y posterior aislamiento es un proceso multifactorial al que todos los acercamientos pueden aportar información y análisis. A las dudas que a veces aparece sobre si algún suceso específico se ha borrado entre especies alejadas (p.e. supresión de ADN egoísta) (Presgraves, 2010(b)) o si las incompatibilidades encontradas se han originado tras haber finalizado el proceso se puede contestar con otra pregunta: ¿En que momento fijamos el punto de referencia de formación de nuevas especies? La respuesta es complicada, pues si consideramos la interrupción total de flujo génico nuestros datos serían marcadores ideales de las etapas finales del proceso al mantener todavía una débil posibilidad de cruzamiento. En el caso de que se considere como criterio el aislamiento precigótico total en la naturaleza (Presgraves, 2010(b)) habría que fijarse en lo que ocurre en el otro extremo de la situación, entre poblaciones aisladas de una misma especie o entre especies más cercanas. En estudios de esas características se obtienen resultados de menor intensidad, pero asimilables a los nuestros en inestabilidad en el desarrollo (Albarrán, 2010; Demontis, 2010; Trotta, 2010; Novicic, 2011), esterilidad o inviabilidad (Bolkan, 2007). Este paralelismo nos indica que el mecanismo desencadenado es el mismo y que los efectos que estudiamos tanto en subpoblaciones, en especies de muy reciente formación como en las nuestras son los que, en diferente grado de intensidad, llevan a la especiación.

Geografía genética de las incompatibilidades

Otro de los planteamientos iniciales de nuestra investigación fue el de intentar comprobar en la práctica e *in vivo* cuantas zonas presentaban incompatibilidad total o parcial entre las especies de nuestro estudio y cuál era su naturaleza. A menudo existe una cierta confusión y se denominan “genes de especiación” a lo que en realidad son zonas cromosómicas (Maside, 1996). En este sentido Orr (Orr, 2004) y Tao (Tao, 2003) exponen una serie de condiciones que deberían tener los citados genes, e incluso existen cuantificaciones de cuántos existen o deberían existir entre otras especies. En la práctica, tomando una denominación para nosotros más adecuada de “loci barrera” (Abott, 2013) las revisiones bibliográficas demuestran que, al menos en su sentido estricto, no son numerosos. Tras casi un siglo de investigación se han descubierto cinco genes de inviabilidad (dos de ellos del mismo sistema), tres de letalidad y seis de esterilidad (Presgraves, 2010(b)) entre todas las especies conocidas, si bien con un sesgo hacia las *Drosophila*, por ser de las más estudiadas.

Nosotros abandonamos el capítulo teórico para centrarnos en la práctica del comportamiento de individuos vivos y determinamos como “zona de incompatibilidad” aquella que no permite la sustitución completa de ese fragmento en ambos cromosomas homólogos. En una hipotética situación natural de hibridación entre especies estas zonas impedirían de manera efectiva la formación de homocigotos, con lo que, según nuestras propias observaciones, el material ajeno en heterocigosis se va eliminando muy rápidamente por recombinación hasta desaparecer completamente.

En nuestro estudio esas zonas se manifestarían como resistentes al protocolo de puesta en homocigosis. A lo largo del cromosoma cuatro de *Drosophila buzzatii* frente a los distintos fragmentos de *Drosophila koepferae* hemos encontrado cuatro zonas problemáticas.

- 4F1-F4 no fue testada por razones básicamente técnicas de reconocimiento. Dentro de las preparaciones del mismo individuo, mostraba asinapsis en un número muy reducido de núcleos, lo que impidió un diagnóstico claro que permitiera la puesta en marcha del protocolo de puesta en homocigosis o en forma de letal *pseudoequilibrado*.
- 4A2-A3 simplemente no apareció como fragmento de tamaño abordable en ninguna de los retrocruces tras las F1
- 4B3-C2 causa letalidad sólo en larvas hembras homocigotas y esterilidad en los machos de esa arquitectura cromosómica, aparte de deformaciones específicas de ala
- el rango comprendido entre 4G1-G3 y 4G3-G5. Como estas últimas solapan y observamos letalidad pensamos más plausible que exista únicamente una sola región problemática en 4G3 que dos, una en cada fragmento. Esta letalidad, expresada en un momento anterior a la formación de la larva, sólo se aprecia al situar la región en homocigosis pero no en heterocigosis, indicando un efecto resesivo

Así pues, en casi todo el cromosoma 4 testado sólo hay dos candidatos a contener loci-barrera absolutos de incompatibilidad entre nuestras especies, con la incognita de otras dos pequeñas zonas cromosómicas. En cualquier caso, los efectos de los estudiados serían recesivos pues no ha habido problema en mantenerlos durante años en forma de construcciones genéticas imitando a letales equilibrados, aunque la recombinación termine eliminando el fragmento. Precisamente esas regiones han sido señaladas como

participantes en combinaciones que podrían producir esterilidad (Marín, 1996), pero la idoneidad de esa asociación se discutirá más tarde.

En general podemos asegurar que la combinación de las distintas regiones introgresadas produce descendencia, con las particularidades que se expondrán a continuación. No se ha encontrado tampoco una imposibilidad de combinación de cualquiera de las zonas sometidas a estudio entre ellas, en todas ellas se obtuvo un porcentaje de descendencia viable y fértil, por lo que tampoco existen interacciones directas entre zonas del autosoma que provoquen aislamiento total entre estas dos especies. La interpretación es claramente que la incompatibilidad que existe entre híbridos de estas especies se debe a la acumulación de factores de baja intensidad y ocasionalmente de efecto más intenso y siempre de naturaleza recesiva.

No se debe deducir una contradicción con los estudios que demuestran interacciones entre varias introgresiones para producir una incompatibilidad de efecto observable, lo que se toma como un patrón general (Welch, 2004), sino que se demuestra una aportación del autosoma menor que la del cromosoma sexual, donde residen muchos de los factores que al interactuar con otras zonas provocan esterilidad o inviabilidad híbrida (Welch, 2004; Presgraves, 2007; Matute, 2014). Comparativamente hablando estos datos apoyan una mayor tasa de evolución del cromosoma X respecto a los autosomas (Naveira, 2003).

Podría pensarse que, dada la mayor separación temporal que presentan nuestras especies frente a las del grupo *melanogaster*, principalmente el par *mel/sim*, las incompatibilidades se habrían acumulado también en los autosomas en una medida proxima al X de las citadas especies. No es así, por lo que podemos afirmar que la aportación de los cromosomas sexuales y asociadamente su influencia en la interrupción del flujo génico es no sólo mayor, sino mucho más rápida que la de los autosomas.

Diferencias entre autosomas y cromosomas sexuales

Uno de los temas de estudio en el proceso de especiación es la distinta mecánica que presentan los autosomas y los cromosomas sexuales. La expresión más común de estas diferencias es la casi universal regla de Haldane, que postula una mayor problemática en el sexo heterogamético híbrido. Aunque existen modelos integradores y nuevas aportaciones a su explicación, tres son las hipótesis más comúnmente aceptadas: la de dominancia, la del macho rápido y la del X rápido. (Koevoets, 2009; Schilthuisen, 2011). Aunque la primera es la que agrupa una mayor cantidad de pruebas experimentales, no se ha determinado todavía un consenso general.

Los criterios para contrastar las hipótesis se basa en colocar a fragmentos ajenos en los autosomas en una situación en la que se encuentren en unas condiciones de cantidad de entorno y material genético similares al cromosoma X del macho (Naveira, 2003). Esto se ha conseguido utilizando organismos haplodiploides, en los que la haploidía de los machos presenta una hemigosis en todos los cromosomas, con resultados de machos más afectados que las hembras, aunque sin poder discernir entre ninguna de las tres hipótesis (Koevoets, 2009).

Al sustituir completamente fragmentos a lo largo de los dos homólogos de un autosoma, con tamaños incluso de un 15%, nuestro estudio consigue exponer a uno de los autosomas como si fuese un cromosoma sexual, revelando todas las incompatibilidades BDM recesivas que permanecían ocultas por la heterocigosis, como se ha reclamado en alguna revisión (Schilthuisen, 2011). También analizamos grandes

fragmentos colocados en heterocigosis enfrentados entre si, otro de los criterios para declarar el efecto mayor del cromosoma X (Naveira, 2003)

El mero hecho de haber podido estabilizar estas líneas ya nos permite discutir las diferencias que existen entre cromosomas sexuales y autosomas. El tamaño introgresado aquí no se habría podido situar en el cromosoma X sin graves consecuencias para el individuo, mucho menos si se pudiese colocar en ambos X de una hembra, sin contar las posibles interacciones con los autosomas. Los autosomas pueden soportar una mayor carga genética interespecífica lo que permite afirmar que la cantidad de incompatibilidades que contienen es menor.

Se ha visto que cualquier fragmento introgresado en el X produce al menos esterilidad, independientemente de su localización, pero también inviabilidad (Naveira, 1986). Ninguna delección es tampoco permitida en ese cromosoma sin desencadenar letalidad de machos (Cuykendall, 2014) También se han encontrado en el par *mel/san* hasta trece factores de inviabilidad que se expresan en heterocigosis en la hembras, pero que no actúan en el macho (que también es hemicígote) (Matute, 2014). La consecuencia demostrada es que el funcionamiento del cromosoma sexual y los autosomas difiere en el sentido de que se confirma que la acumulación de incompatibilidades BDM es mayor en el cromosoma X, teniendo por tanto una mayor contribución a la disminución de *fitness* y al aislamiento genético entre especies (Matute, 2014). Esta afirmación reforzaría la posición de las hipótesis del macho rápido, o del X rápido, aunque sin poder discernir entre ellas sin nuevos estudios sobre expresión diferencial en genes específicos de macho y hembra (Schilthuizen, 2011). El hecho de no descartar ninguna de las teorías podría ser un dato para la síntesis de las tres siguiendo un modelo de integración (Turelli, 1995).

La esterilidad y el retraso de la formación del esperma

En este capítulo de nuestro trabajo intentamos aportar datos a alguno de los principales efectos que tiene la hibridación sobre aspectos de la *fitness* general del individuo, como son la esterilidad, la inviabilidad y las alteraciones en el desarrollo normal. La mayoría de los trabajos sobre híbridos se realizan sólo en la F₁, y pocos llegan a la F₂ (Novicic, 2011) y más allá, por lo que en realidad enfrentan medio genoma de una especie contra la otra mitad del otro con resultados de esterilidad de todo o nada. Nuestros datos se refieren a sustituciones más pequeñas, estables durante cientos de generaciones y que permiten dilucidar si las manifestaciones observadas por otros estudios son un efecto específico de la F₁ o es un producto más tardío (Butlin, 2012)

Aunque nuestro acercamiento considera la presencia de esperma móvil como muestra de fertilidad potencial (Naveira, 1992) y alguna vez se ha discutido su idoneidad para estudiar la esterilidad (Morán, 2014), también usamos *de facto* el test de fertilidad alternativo basado en la producción de descendencia, pues nuestros individuos son uniformes genéticamente y dejan descendencia, las líneas obtenidas son fértiles y se mantienen en el tiempo generación tras generación. Sólo con este test no habríamos podido discriminar los fenómenos de retraso en la formación del esperma que hemos observado que no conllevan esterilidad pero sí alteraciones en la formación de la línea germinal. De hecho existen diferencias claras incluso en el tiempo de desarrollo germinal entre las dos especies parentales, así como en los híbridos entre ambas especies

El tiempo promedio de desarrollo de esperma móvil se acerca al de *D. buzzatii* pero existe un retraso que está en correlación directa con el tamaño de la introgresión de *D. koepferae*, independientemente de su

posición, por lo se puede determinar que la alteración en la línea germinal es producida por características inherentes al fragmento cromosómico ajeno, probablemente un conjunto de pequeños factores que funcionen aditiva, exponencial y/o epistáticamente y que provocan ese retraso en la formación del esperma, aunque no esterilidad de los machos. Este resultado corrobora el encontrado en el par *sim/mau*, que introgresando partes del cromosoma X de pequeño tamaño encontró un efecto similar (Maside, 1998)

El hecho de que la arquitectura cromosómica también influya siendo máxima su influencia en fragmentos en homocigosis, media en dobles heterocigosis *trans*, y mínima en heterocigotos simples apunta a que los factores citados tienen una naturaleza recesiva, de efecto menor, que se manifiesta en toda su extensión al no existir al menos una copia de la especie receptora. Este fenómeno sería consistente con la alteración de la fuerza de unión de factores de transcripción a los promotores, variando su regulación, como se ha visto en otras investigaciones (Michalak, 2003)

Marín afirmaba que la esterilidad en los híbridos de nuestras especies podría ser producida por intervención de pares de cuatro factores en el cromosoma 4, el 4Bla-B3c, 4Ele-E3e, 4Glb-Glc, 4F3a-F4d (Marín, 1996). Nuestros resultados rechazan su explicación. Hemos conseguido fijar en homocigosis 4A4-B3 (por partida doble e independiente), 4E1-E5(w) y en forma de letales *pseudoequilibrados*, 4B3-C2, 4G1-G3 y 4G3-G5, fragmentos que contienen a los citados, por lo que la combinación de factores propuesta no es real, aparte de que en su hipótesis contemplaba fragmentos que al combinarlos superaban el tamaño umbral propuesto para la esterilidad (Naveira, 2003).

No se ha encontrado esterilidad en ningún caso, pese a que los homocigotos contendrían una doble copia de los “factores” de Marín, sin interferencias de una posible recesividad, así como tampoco en la combinación de ellos (dobles heterocigotos *trans*) ni en la combinación con otros fragmentos o con la cepa salvaje de referencia. La atrofia testicular en el 30% de los machos 4E1-E5(w), así como el retraso en el desarrollo del esperma en el resto de los homocigotos, pero no en los heterocigotos simples o dobles de similar tamaño de introgresión, apuntan más claramente a una confirmación de la hipótesis poligénica con factores mayormente recesivos que quedan de manifiesto en los homocigotos y provocan un efecto mayor (Naveira, 1986; Morán, 2014)

Tampoco si usamos los datos corregidos de posición a 4A-A4b, 4Clad, 4 D3c, 4Flb, 4G3a (Marín, 1996), observamos esterilidad en ningún fragmento de los estudiados y aunque no podemos discutir sobre 4F1 ni 4A1 y 4A4, hemos flanqueado a este último sin el efecto propuesto.

Lo que si parece existir es un factor que por si mismo produciría inviabilidad de hembras y esterilidad de machos homocigotos en 4B3-C2, que comprende al propuesto, y otro en 4G3, que coincide exactamente. Es posible pues que en la estimación de Marín estos efectos hayan desorientado el análisis y sesgado las conclusiones.

Siendo estrictos y utilizando el criterio de esterilidad de la mayoría de los trabajos en este campo, no hemos encontrado esterilidad en ninguna de las combinaciones genéticas establecidas, pues todos los tipos de machos construidos desarrollaron esperma móvil y han dejado descendencia, aunque su línea germinal haya sido afectada en forma de retraso en el desarrollo. Sólo a partir de un límite del 15% de cromosoma en homocigosis los efectos combinados producen esterilidad total por atrofia testicular, pero ni siquiera en el total de individuos, sino en un porcentaje estable del 30% de los machos, lo cual además relacionaría dos de las anomalías más comunes en híbridos: la esterilidad y los problemas en el desarrollo. Aunque no es descartable un efecto local en 4E1-E5(w), el comportamiento general del resto de los fragmentos apunta

mayormente a un efecto poligénico acumulativo; un fragmento mayor en homocigosis plantearía tal cantidad de machos estériles por atrofia que la línea se desestabilizaría rápidamente.

Estos datos se ajustan a un efecto umbral (Naveira, 1986; 1992; Maside, 1995; Morán, 2014) en la esterilidad, con multitud de pequeños factores repartidos por todo el cromosoma, de modo que una mayor cantidad de material ajeno iría desestabilizando la línea germinal hasta bloquearla totalmente. El umbral lo situaríamos en aproximadamente un 15% de cromosoma ajeno en homocigosis⁵, que corresponde aproximadamente con un 5% del genoma (Naveira, 1986; Morán, 2014). Curiosamente en una misma cantidad de genoma introgresado, Sawamura encuentra hasta seis factores de esterilidad entre *mel/sim* (Sawamura, 2000), pero es probable que haya identificado como factor “mayor” el sumatorio de múltiples efectos menores, como ya ha sido demostrado (Maside, 1996)

Este dato del 5% es ligeramente menor, pero se acerca mucho y confirma estimaciones de otros estudios que fijan este límite en el 6-7% (Morán, 2014), o 7-9% (Naveira, 1986). La explicación de las diferencias podría deberse a que:

- i) conseguimos el máximo fragmento que permite una fertilidad parcial de la población, mientras que esos estudios cuantifican el mínimo fragmento que provoca esterilidad total
- ii) la disposición en homocigosis del cromosoma introgresado es un factor que potencia la esterilidad, señalando la recesividad de los efectos

Inviabilidad y la caída de *fitness* general

Muchas de las investigaciones realizadas en el siglo que ha pasado desde que Sturtevant descubrió en 1920 que los híbridos entre *Drosophila melanogaster* y *D. simulans* presentaban problemas de esterilidad e inviabilidad se han centrado en esas especies y en el estudio de la raíz de esos procesos en la F₁, desde un punto de vista absoluto de vida-muerte. Nuestro acercamiento se amplía de las especies tipo del grupo *melanogaster* a otras *Drosophila*, proporcionando datos de fragmentos parciales del genoma distribuidos por la totalidad de un cromosoma y contabilizando la inviabilidad desde dos puntos de vista complementarios. Por un lado se analizan los resultados sexo dependientes en un intento de mostrar relaciones autosomas-cromosomas sexuales y por otro la inviabilidad frente a lo que sería una línea salvaje no hibridada. Con ambas medidas relacionadas respecto a un control, en un caso el sexo mayoritario y en otro la especie salvaje de referencia, se permite un acercamiento cuantitativo que permite localizar factores concretos, efectos de fondo que influyen sobre la *fitness* general del individuo y permite localizar el comportamiento parcial de regiones cromosómicas. Además este acercamiento transforma en cuantitativa la visión habitual del todo o nada, que usa criterios más o menos arbitrarios de con qué porcentaje se considera un efecto letal o no y que sólo analiza la totalidad de un genoma frente al otro en porcentaje del 50% (Matute, 2014)

⁵ El cálculo del porcentaje en un homocigoto se calcula multiplicando por dos el del heterocigoto correspondiente, para normalizarlo con los estudios que lo calculan respecto a la cantidad de genoma haploide. También hay que considerar que el porcentaje en nuestro caso se calcula sobre el total del cromosoma 4, y no del 2 como hacen los estudios referenciados. El resultado con esta referencia sería levemente menor

Inviabilidad vs deriva gamética

La principal fuente de divergencia dentro de nuestros datos viene por diferencias significativas en la cantidad de machos y hembras en la descendencia de muchos de los cruzamientos propuestos. La primera discusión debe ser el origen de estas diferencias con dos explicaciones alternativas: inviabilidad por mortalidad de los individuos en alguna fase de su desarrollo o deriva gamética por problemas en la formación diferencial de gametos en los progenitores.

Los resultados obtenidos señalan mayormente a la inviabilidad como fuente de diferencias sexo-específicas y no a la deriva meiótica. Los datos bibliográficos indican que ésta última se produce habitualmente por la actuación de disruptores de la meiosis asociados en muchos casos a la movilización de trasposones o la ruptura de elementos de control de esa movilización (Brideau, 2006; Phadnis, 2009) que actúan en zonas concretas con una localización específica habitualmente de heterocromatina (Zhang, 2015). La comparación con nuestros resultados descarta este efecto pues la variación de la ratio sexual es general para cualquier fragmento independientemente de su localización, si bien con intensidad variable. Se podría decir que es una característica producida a lo largo de todo el cromosoma, y extrapolando, probablemente en cualquier autosoma con introgresión.

Otra de los datos que rechazan la deriva meiótica frente a la inviabilidad sería la ausencia de reorganizaciones cromosómicas. La movilización o duplicación de secuencias tiene como consecuencia la aparición de reordenaciones cromosómicas (Lim, 1988; Evgenev, 2000; Maumus, 2015). No es posible saber exactamente cuantas preparaciones de cromosomas politénicos se han realizado en este trabajo, pero en una estimación conservadora podemos situarla por encima de las cincuenta mil y en ningún caso se ha observado ningún tipo de reordenación o variación observable en la estructura del cromosoma 4.

El último resultado que confirma la inviabilidad frente a la deriva meiótica, probablemente el más definitivo, es la alteración de la ratio sexual en cruces con machos de cualquier línea homocigota con hembras de fondo genético *D. buzzatii* SL 101 w. No ocurre lo mismo con cruces similares de *D. buzzatii* SL 6, (ver tabla y análisis de la página 128 y siguientes), por lo que podemos concluir que existe un conflicto genético entre el fondo cromosómico *D. buzzatii* SL 101 w, es decir, un efecto materno, con una posible causa a un polimorfismo génico en la mitocondria de las distintas dentro de las poblaciones de *D. buzzatii*. Precisamente la falta de desviación en cruces de *D. buzzatii* SL 101 w x 4E1-E5(w) del mismo fondo genético, es otro dato que apoya esta afirmación.

La falta de homogeneidad en el 76% de los cruces recíprocos de los distintos homocigotos entre sí (ver tabla y análisis de la página 130) apunta también a ese efecto materno pues al menos un 57% tienen como hembra progenitora las citadas *D. buzzatii* SL 101 w, y a 4E1-E5(w) (datos en páginas 128 y 134).

Sin embargo este efecto no explicaría la totalidad del descenso en machos. Aparece otro factor que incrementaría el efecto y que sería la propia incompatibilidad de fragmento de *D. koepferae* con *D. buzzatii*. En este caso el tamaño del fragmento introgresado sería un factor acumulativo para el desequilibrio, pues los homocigotos más grandes son los que también producen desviaciones más significativas de la ratio sexual (datos en páginas 134 y 138).

Un tercer factor actuando sí podría ser deriva meiótica de origen localizado. Los machos con el fragmento 4D1-D5 tienen un comportamiento opuesto al de los demás, pues cuando intervienen se produce desviaciones significativas de la ratio sexual hacia falta de hembras en la descendencia, no de machos. (ver tabla página 134) . La excepción a la regla se produce cuando se cruzan con el fondo genético de *D. buzzatii* SL 101 w (o 4E1-E5(w)), las diferencias se invierten y son los machos los menos numerosos. La explicación podría ser que el efecto materno demostrado para ese fondo genético enmascare esta posible deriva meiótica.

Momento de la inviabilidad

El segundo punto de discusión tras haber determinado que realmente existe inviabilidad es el momento en el que se produce. La identidad observada en las variaciones de ratios sexuales entre híbridos adultos y larvas de tercer estadio descarta que sea en la pupación o emergencia y señala a un momento anterior, entre la formación de gametos del reproductor y el desarrollo embrionario temprano. La homogeneidad entre réplicas del mismo experimento también señalaría un momento temprano de origen genético, pues los resultados se repiten pese a la variabilidad ambiental de ambas repeticiones.

Obtenemos otra indicación hacia el entorno embrionario por el efecto materno descubierto con la cepa *D. buzzatti* SL 101 white expuesto en el parágrafo anterior. Las incompatibilidades por esta causa se manifiestan en fases muy tempranas del desarrollo, probablemente por incongruencias en el proceso de transición materno-cigótico (Gerard, 2012) o incompatibilidades nucleo mitocondriales. Ese mismo efecto, pero incrementado se ve en cruces con la línea transgénica 4E1-E5(w), del mismo fondo genético, confirmada por dos réplicas (ver tabla y análisis de la página 134). No se ha encontrado el mismo resultado en cruces con la línea salvaje *D. buzzatti*, pero se ha visto que el cruce de machos *D. buzzatti* con hembras *D. buzzatti* SL 101 white produce inviabilidad por efecto materno, indicando la heterogeneidad genética entre poblaciones de la misma especie, y potenciado por los efectos de la introgresión. Algo similar ya ha sido vista en el par *sim/mel* (Gerard, 2012) y se considera que la mortalidad en las hembras híbridas de este par es producido por un efecto materno (Pal-Bhadra, 2006), coincidiendo con nuestros resultados.

En la misma línea señalan trabajos de análisis de transcriptoma en *D. simulans* y *D. melanogaster*, en los que la hibridación produce alteraciones en la expresión de los genes, sobre todo sexo-específicos, que se traduce en anomalías del desarrollo de la línea germinal, explicándose por la alteración de unos pocos genes en el desarrollo temprano de esa línea y que se observan por anomalías en el desarrollo temprano del abdomen que lleva a la letalidad (Ranz, 2004)

Aunque Presgraves encuentra la letalidad entre híbridos de esas mismas especies tanto en fase postembrionaria como en la transición materno-zigótica y da poca importancia a esta última (Presgraves, 2003), estudios posteriores entre las mismas especies determinan ese momento como capital (Gerard, 2012), explicándolo por problemas de compatibilidad cromosómica en la mitosis (Bolkan, 2007; Ferree, 2009) o por defectos de segmentación en el embrión temprano (Gavin-Smith, 2013). Otro estudio que apoya la letalidad temprana se observa en la fase precelular entre las divisiones 10 y 13 por defectos en la mitosis por incompatibilidad cromosómica (Ferree, 2009), consistente con las primeras olas transcripcionales del cigoto entre la 8 y la 14, donde el control de la síntesis y estabilidad de las proteínas y los ARN_m son capitales en el

desarrollo (Tadros, 2009) Esto convertiría a la inviabilidad en una alteración del desarrollo normal del organismo.

En cualquier caso las dos fases más delicadas del desarrollo donde se suele expresar la inviabilidad híbrida son precisamente la fase embrionaria y la pupación como se observa en cruces híbridos de *mel/sim/san* (Matute, 2014), por lo que no es sorprendente esta aparente discrepancia que se resuelve con la consideración de que el origen de las malformaciones que llevan a la inviabilidad se originan primariamente en las fases muy iniciales del desarrollo (Gavin-Smith, 2013) o por retraso en el desarrollo (Chatterjee, 2007) y que se expresan antes o después dependiendo de la intensidad de la incompatibilidad a menudo dependiendo de la distancia entre las especies comparadas. Es señalable que uno de nuestros resultados señalaría al fragmento 4A1 como responsable de mortalidad temprana de machos y de hembras en fase de pupa, compensando el ratio sexual (ver página 135). Aunque este efecto es discutible porque sólo se encontró cuando actuaba este fragmento en solitario y no en combinación, precisamente esto podría enmascararlo por la mayor influencia de introgresiones de mayor tamaño e impacto.

Causa de la inviabilidad

Analizando los datos de inviabilidad sumados a los de productividad parece evidente la existencia de pequeños factores recesivos y acumulativos que perturban la viabilidad del individuo al interrelacionarse con otras zonas interespecíficas, coincidiendo con otros estudios (Presgraves, 2003; Gerard, 2012; Sherman, 2014). La regla de Haldane se cumple, la inviabilidad que observamos es mayor en el sexo heterogamético, por la existencia de incompatibilidades epistáticas que se deben a rupturas de complejos génicos situadas en gran parte en el cromosoma X (Presgraves, 2003). Por tanto, y considerando que nuestras especies se han separado mucho antes que estas *Drosophila* (4,5 frente a 0.8 millones de años) la estimación de 191 factores de letalidad que se ofrecen para *D. simulans* y *D. melanogaster* (Presgraves, 2003) no parece adecuado en nuestras especies, señalando hacia factores más pequeños y numerosos que funcionarían con un efecto umbral que se vería modulado por factores intrínsecos, pero también extrínsecos como la temperatura, a la que nuestros híbridos demuestran una alta sensibilidad, coincidiendo con los machos (Barbash, 2010) y hembras híbridas de *D. melanogaster* y *D. simulans*, que aumentan su mortalidad cuando se someten a altas temperaturas (Orr, 2004) o estrés salino (Bolkan, 2007). Es destacable que esta sensibilidad a la temperatura en híbridos también se haya encontrado en estudios de esterilidad entre *sim/mau* (Maside, 1998), apuntando a una desregulación común en ambas manifestaciones.

Podemos encontrarnos zonas de especial divergencia o efecto. En nuestras especies y en el cromosoma 4 encontramos sólo dos: los fragmentos 4G3 y 4B3-C2, que hemos tenido que estudiar en cepa de letal *pseudoequilibrado*. La heterogeneidad genética de estas líneas no permitió aplicar la misma metodología que al resto, pero los análisis cromosómicos detectan homocigotos interespecíficos en larvas de tercer estadio que no aparecen entre adultos por lo que parece que al menos parte de la inviabilidad se produciría en el proceso de pupación, acorde con otros estudios (Carvajal, 1996; Orr, 2004).. Es destacable que la mortalidad sexo dependiente se produzca mayormente entre hembras 4B3-C2, como ocurre en híbridos entre *D. simulans* y *D. melanogaster* (Orr, 2004), aunque la correspondencia cromosómica entre especies descarte que se trate de uno de los factores descritos en esas especies. En esta misma línea, no es descartable que parte de la inviabilidad en los heterocigotos dobles trans se produzca en la pupación,

apoyándose en los datos de los pocos cruces en los que larvas y adultos no se comportan homogéneamente (ver tabla página 129)

En la otra zona encontrada (4G3) la inviabilidad en homocigotos no es sexo específica. Por tanto estos fragmentos parecen contener un factor que aunque recesivo, aporta un efecto de mayor importancia que no permite la sustitución total cromosómica y serían equivalentes a los factores de inviabilidad encontrados sobre el cromosoma X de otras especies. En nuestro caso la letalidad se produce sólo en homocigosis y se permite en heterocigosis por la naturaleza recesiva del factor.

La interpretación de la inviabilidad como producto de la alteración del estado de condensación o estructura de la cromatina (Ferree, 2009; Barbash, 2010) no sería contradictorio con nuestros datos, sino más bien un apoyo. Las asinapsis de los cromosomas homólogos en los fragmentos introgresados indican diferencias estructurales básicas en la cromatina y podrían ser una de las causas de esos pequeños factores recesivos acumulativos, correlacionados físicamente con la cantidad de cromosoma introgresado. No se puede olvidar que las asinapsis somáticas específicas aparecen a partir de una cierta distancia entre especies (no lo hacen, por ejemplo, en el grupo *melanogaster*) (Carvajal, 1996), por lo que indican una cierta diferencia de fondo. Nuestros datos ampliarían este efecto del X donde habitualmente se estudian a los autosomas, aunque con la particularidad de un menor efecto por unidad introgresada. Apoya esta afirmación otro de nuestros resultados que encuentra una mayor inviabilidad sexo dependiente correlacionado con la cantidad de material introgresado. En el estudio de productividad frente a cepa salvaje se aprecia de nuevo el mismo comportamiento, modulado en este caso por la arquitectura cromosómica. El mismo tamaño en introgresión tiene un efecto mayor sobre la viabilidad del individuo si se presenta en homocigosis que si lo hace en doble heterocigosis *trans* o sólo en un cromosoma de los homólogos, aportando la estructura cromosómica ajena como responsable de la inviabilidad temprana. Los efectos maternos, mitocondriales u ovocitarios serían también muy a tener en cuenta como reflejos del conflicto intragenómico, de los que también hemos dejado constancia

Nuestra investigación no permite discriminar si existiese algún efecto de sustitución de simbiontes en la formación de incompatibilidades (Bruckner, 2012), factor que no se puede olvidar, aunque de nuevo el hecho de obtener unos resultados homogéneos en todo el cromosoma introgresado no asociado a una hipotética localización concreta de genes específicos de inmunidad y el usar cepas largamente conservadas en laboratorio con dieta altamente estable y controlada lo descartaría como un factor de importancia en las incompatibilidades encontradas.

Anomalías del desarrollo

La estabilidad de los procesos de desarrollo es un principio universal en todos los seres vivos pluricelulares. Alcanzar una morfología y fisiología similar o compatible a tu propia especie garantiza durabilidad y posibilidad de transmisión genética, por lo que se han desarrollado sistemas para compensar las variaciones imponderables en aspectos ambientales, tanto externos como internos (Debat, 2011). Sin embargo la aparición de anomalías en el desarrollo es un fenómeno relativamente habitual en el estudio de híbridos interespecíficos o mutantes de *Drosophila*. En los estudios analizados estas deformaciones tienen un tratamiento desigual: se tomán como un efecto colateral esperado (Presgraves, 2003), se asocian a la

actuación de una zona cromosómica concreta (Sawamura, 2000), un gen o ruta reguladora específica (Macías, 2004; Muro, 2006) o simplemente las citan sin más (Hollocher, 1991 en Johnson, 1993).

Nuestros datos constatan el hecho de que arquitecturas genéticas con fragmentos autosómicos interespecíficos en heterocigosis simple, doble *trans* o en homocigosis de cualquier tamaño y localización también producen deformaciones en un porcentaje significativo. La aparición de *Drosophila* alteradas no representa una novedad, pero la comparación con fenotipos similares o idénticos descritos ya en la bibliografía y con asignación clara a un efecto concreto permiten analizar los resultados aportando tres líneas de debate: la causalidad, persistencia y ubicuidad de dichas anomalías

La causalidad ha quedado patente en capítulo correspondiente de resultados al obtener una expresividad variable de alteraciones por errores en el desarrollo, algunas muy similares a mutaciones conocidas y claramente localizadas cromosómicamente como *miniature*, *curly*, *curved*, *eyeless* o *wingless*, otras más comunes en estudios de desarrollo como las genitalias rotadas y fluctuaciones de la asimetría, fundamentalmente abdominal y otras menos comunes como los palpos o *antenna* fundidos. De los miles de individuos analizados siempre han aparecido fenotipos aberrantes en híbridos y en ningún caso en las líneas salvajes de procedencia para nuestro nivel de observación, lo que coincide con estudios incluso de grupos tan alejados como los moluscos gasterópodos (Schilthuisen, 2011). Resulta evidente que los fragmentos ajenos producen un desequilibrio en alguna etapa o algún producto de la línea de desarrollo y es estadísticamente significativo la relación directa entre cantidad de material introgresado y aparición de deformidades, pero la imposibilidad de fijarlos en líneas con un fragmento concreto que exprese una determinada anomalía demostrarían una base no ligada a una zona o gen concreto sino a un conjunto de procesos relacionales entre diferentes ambientes intragenómicos.

Siendo rigurosos hay que destacar que la región 4B3-C2, en la que no funcionó la técnica de sustitución del fragmento cromosómico, si parece asociarse específicamente al desarrollo incompleto de la vena alar L5, sobre todo si asumimos que un buen criterio para detectar genes o zonas implicadas en el desarrollo de un fenotipo es la pérdida de función. Este resultado es idéntico al encontrado en *Drosophila melanogaster* con el gen CG3998 (Cruz, 2009) y aunque su posición en el cromosoma 2L correspondería al 3 de *Drosophila buzzatii* y no al cuatro, su estructura de dedos de zinc y su probable función como regulador nos indicaría que hemos localizado una zona cromosómica con las mismas características o participante en el mismo proceso regulatorio, además, este efecto no es exclusivo de esa zona: aparece como alteración en otros lugares del cromosoma, aunque con una proporción mucho menor.

La persistencia de estos fenotipos es otra de sus características. Aparecen siempre con baja penetrancia, coincidente con otros trabajos (Schilthuisen, 2011) y con significación estadística y proporción relativamente estable en cualquiera de las líneas obtenidas en las condiciones ambientales del estudio, pero también y de modo similar en condiciones de temperatura restrictivas. Podemos así aportar datos en el problema de muestreo insuficiente que cubra zonas con distintos niveles de estrés ambiental o genético (Tsujino, 2014) al testar un 20% del genoma y prácticamente la totalidad de un autosoma con fragmentos ajenos. Nuestros resultados ofrecen una visión bastante completa del fenómeno, mostrando una importancia relativa menor de las variables ambientales frente a las genéticas.

Y precisamente esta ubicuidad genética es el aspecto más destacado. Siempre encontramos en la bibliografía o bien una indefinición (Hollocher, 1991 en Johnson, 1993) o una asignación demasiado específica (Macías, 2004; Muro, 2006; Debat, 2011) y precisamente lo que ocurre es que cualquier fragmento introgresado puede producir cualquier fenotipo aberrante. Nuestros datos no permiten asignarse a la

actuación directa de un gen o región del ADN, con la excepción de la venación incompleta que produce el fragmento 4B3-C2. Cualquier zona introgresada, tanto en disposición homocigota, como en doble heterogocigota *trans* o simple puede originar una variada muestra de alteraciones severas. No es la posición solamente, sino sobre todo la cantidad de material lo que influye en la presencia de deformidades, pudiéndose establecer una proporcionalidad directa entre la cantidad de ADN externo a la especie y la proporción de fenotipos anormales en la descendencia. Esta proporcionalidad apoyaría un mecanismo aditivo, que en determinados individuos y condiciones superarían los controles orgánicos del tipo de la *ciclina G* o *Hsp 90*, (Debat, 2011; Faradji, 2011), que garantizan una arquitectura individual propia de la especie

La naturaleza de los datos obtenidos no permite ahondar más allá en las causas profundas de estas incompatibilidades pues debemos señalar que se ha sacrificado número por precisión en los análisis y que sólo se han registrado anomalías severas visibles a la lupa, de la misma manera que otros estudios sobre deformaciones de la genitalia en híbridos de gasterópodos (Schilthuizen, 2011). Los análisis morfométrico profundo de otros trabajos revelan una mayor proporción de individuos con fluctuaciones de asimetría (Beasley, 2013) y permitirían probablemente una cuantificación de los efectos más sutiles. La comparación con investigaciones que obtienen fenotipos idénticos a los nuestros utilizando variadas metodologías, en la mayoría de los casos sin uso de híbridos intraespecíficos nos permite especular sobre una explicación. Dos posibilidades aparecen: por un lado los individuos alterados nos recuerdan a fenocopias, pero sin localización génica clara. La asunción de esta premisa haría tomar importancia al ambiente en el que los embriones, larvas y pupas se han desarrollado, en la que la inestabilidad genética producida por la introgresión hace a un porcentaje de individuos sensibles a un desarrollo erróneo.

La otra explicación complementaria pero no excluyente sería que la presencia de los fragmentos cromosómicos de otra especie provoca un número de incompatibilidades intragenómicas que los resultados demuestran proporcionales al tamaño introgresado y que producen un aumento intenso del llamado “ruido del desarrollo”, que afecta aleatoriamente en amplitud y direccionalidad a los lados derecho e izquierdo del cuerpo y que provocan la llamada fluctuación de la asimetría lateral, producida al alterar el delicado ambiente de interacciones intragenómicas y/o la secuencia temporal de procesos. Existen estudios intraespecíficos sobre el ala que detectan este fenómeno como una situación normal dentro de las poblaciones, pero lo hacen mediante análisis morfométricos capaces de manifestar pequeñas desviaciones (Tsujino, 2012). La conclusión de ese mismo trabajo de que el control de la morfogénesis del ala está determinado por multitud de genes sometidos a distintos controles y en diversos ambientes físicos y genéticos (Tsujino, 2012) no hacen más que confirmar el hecho de que la introgresión de fragmentos interespecíficos podrían desequilibrar gravemente muchos de esos controles y el ambiente íntimo en el que se desenvuelve el individuo. No olvidemos que las *Drosophila* transgénicas muestran asimetrías graves visibles a simple vista y no sólo en el ala, sino en distintas partes del cuerpo.

Se ha cuestionado la denominación como ruido de desarrollo de la problemática que se encuentra en los híbridos interespecíficos de *Drosophila* (Rego, 2006), así como de la asociación de su principal expresión fenotípica, la fluctuación en la asimetría, como medida de este fenómeno y de respuesta a un estrés genético o ambiental (Lens, 2002; Tsujino, 2012). Carreira no encuentra diferencias significativas en la asimetría fluctuante entre las especies que utilizamos y sus híbridos (Carreira, 2008), pero creemos que su estudio es sólo parcialmente asimilable a nuestro caso. El rechazo de fenotipos de alas deformadas, el análisis de sólo 20 individuos de media y el uso de una F₁, donde es máxima la heterocigosidad y no se ha producido todavía la ruptura de complejos génicos coadaptados típica a partir de la F₂ (Graham, 1984; Garnier, 2006),

aparte de la posible selección de combinaciones génicas positivas (Novicic, 2011) hace lógicas sus conclusiones, pero no comparables a nuestros resultados. Rego, utilizando también F₁ de otras especies de *Drosophila*, opina que los fenómenos de canalización y estabilización de desarrollo son procesos distintos (Rego, 2006), pero el que sea uno o dos procesos separados, o que parte de la asimetría tenga un sesgo direccional resulta intrascendente para nuestros resultados frente al fenómeno que la causa, que resulta de gran intensidad en los individuos afectados, nunca en especies paternas y que los lleva a una desproporción lateral incluso de gran parte del cuerpo, pese a la rareza de una asociación de varios de estos fenotipos puntuales en los estudios sobre fluctuación en la asimetría (Lens, 2002).

En cualquier caso la aparición de discrepancias como las que observamos se producen por inestabilidad en el desarrollo, falta de canalización o ambas, puesto que ambos lados del individuo están influenciados por los mismos genes y por los mismos condicionantes ambientales (Debat, 2011). La baja proporción de anomalías de alto grado sería una consecuencia de la rotura en esos individuos de los mecanismos de canalización del desarrollo al verse alterado el ambiente intracelular en una medida que superaría un umbral de tolerancia. Los otros individuos de genotipo idéntico pero sin deformaciones aparentes no superarían ese nivel por factores meramente aleatorios, probablemente microambientales y serían reconducidos a fenotipos normales o levemente alterados, o simplemente no acabarían su desarrollo por inviabilidad en etapas más tempranas, lo que también podría explicar nuestros resultados de descenso significativo de productividad de las hembras híbridas asociado a cantidad y posición de material introgresado.

Aunque resulta evidente que se debe una alteración local por sustitución de una zona de *Drosophila buzzatii* por la correspondiente de *Drosophila koepferae*, la búsqueda de la causa última lleva a la comparación con fenotipos similares en otros estudios, como *genitalia* rotada, ala reducida, anormal o no desplegada (Cruz, 2009), ojo reducido (Muro, 2004; Daish, 2004; Macías, 2006) o alargamiento del proceso de desarrollo, entre otros. Asociando el efecto con la causas citadas en estos trabajos interpretaríamos que nuestros híbridos tienen comprometida la actuación de las rutas en las que intervienen la *ciclina G*, proteína que regula los tiempos del ciclo celular y que interviene en el control de la estabilidad morfológica de *Drosophila*, (Debat, 2011; Faradji, 2011) o *Dilp-8*, que controla el momento de entrada en fase de pupa (Garelli, 2012; Colombani, 2012) o la cadena de control de la apoptosis (Muro, 2004; Daish, 2004; Macías, 2006; Cruz, 2009) o el sistema de control de la estabilidad de la cromatina mediado por chaperonas del tipo *Hps 90* (Gilbert, 2007) y probablemente muchos otros sistemas. Resulta interesante resaltar el trabajo de Desmontis en el que observa asimetría fluctuante más intensa en rasgos controlados desde el cromosoma X, indicando hasta que punto la base de las divergencias es genética y avanza a un ritmo más acelerado en los cromosomas sexuales (Desmontis, 2010).

La divergencia aparente con nuestros resultados se da en el hecho de que no obtenemos una asignación a una región cromosómica de cada defecto, por lo que la armonización más plausible de nuestras observaciones con estudios en los que se asignan efectos similares o idénticos con actuaciones de genes concretos o de mutantes conocidos sería la alteración en distintos puntos de las rutas metabólicas o de regulación en donde esos genes actúan, produciendo fenotipos similares pero no asignables a una acción concreta. El momento de ese desequilibrio podría producirse a cualquier nivel y aunque muchas de las anomalías encontradas en la bibliografía coincidentes con las observadas en nuestro trabajo tienen relación con la rotura por distintas técnicas experimentales de las rutas de regulación de la apoptosis, no es descartable que se desencadene a partir de algún punto anterior en la secuencia reguladora, incluso en la formación de la polaridad del ovocito, si asimilamos nuestras alteraciones de segmentación abdominal a los

producidos por fallos en la estabilización de los componentes citoplasmáticos del ovocito (Wang, 1991), o a la importancia de la *Hsp 90* materna en la estabilización de la cromatina ante variaciones (Gursky, 2012). En este último aspecto no hay que olvidar una prueba básica de la diferencia íntima entre la estructura cromatínica de las dos especies: la formación de asinapsis entre los fragmentos de cromosomas homólogos de las especies en estudio.

Los morfógenos de los que depende la simetría, así como otros patrones como la longitud del embrión también son equilibrados por una red de determinantes genéticos que provienen de la madre (Gursky, 2012). La falta de robustez de los híbridos podría ser una consecuencia de la alteración genética del adulto progenitor que se “heredaría” en el desarrollo de la descendencia. No hay que olvidar tampoco el proceso de transición materno cigótico es dependiente de la especie, y se asocia a cambios en la activación sucesiva de distintos factores de transcripción (Tadros, 2009). Un pequeño cambio en el momento de desestabilización de los productos maternos frente a los cigóticos conllevaría severas alteraciones.

Otro aspecto que no se debe olvidar es el hecho de que las interacciones intracelulares que conlleva la organogénesis, pero también muchos otros procesos, se han descubierto realizadas por proteínas multiméricas de orígenes genéticos diversos (Macías, 2004; Muro, 2006), complejos multiproteicos o de actuación directa sobre el ADN como reguladores de transcripción (Gerhold, 2011) o fenómenos en los que se varía la fuerza o el número de sitios de unión de determinados pares, como *bicoid* y *hunchback* para reducir el ruido de desarrollo (Holloway, 2011). Si asumimos esta explicación, la procedencia interespecífica de uno o varios de los monómeros o de las zonas de unión al ADN podrían provocar una fusión inestable o defectuosa que desencadenaría desde absoluta invibilidad, inestabilidad condicionada a pequeñas alteraciones, o desde luego ningún efecto.

Interpretamos estos resultados como una prueba de la base íntimamente genómica del proceso de formación de un individuo, de manera coincidente a otros trabajos de hibridación (Albarrán, 2010). La sustitución de una zona cromosómica por otra de otra especie, aunque esté muy relacionada, desequilibra las interacciones y las regulaciones intergénicas generales y probablemente el tiempo correcto en el que se deben producir cada paso en el desarrollo. Las consecuencias que observamos son un resultado que dependerá probablemente en un alto grado de una variedad de pequeños factores ambientales e intraembrionarios que no somos capaces de controlar. Lo realmente importante es la desestabilización producida por las secuencias de ADN introducida muy similares en especies tan cercanas como las de nuestro estudio, pero suficientes para producir efectos muy drásticos en algunos individuos. En general no podemos asignar la anormalidad a una zona, sino que el efecto es difuso y puede aflorar en cualquier línea en cualquier momento.

Integración de procesos

Hasta ahora se ha discutido sobre los distintos efectos que tiene la introducción de material genético interespecífico sobre aspectos de la *fitness* de los individuos, pero inevitablemente surge una pregunta: ¿Es posible encontrar una causa integradora de todos los efectos?

El análisis de nuestros datos sumados a estudios de otros autores permiten postular una explicación general. Especulamos sobre la posibilidad de que el cambio evolutivo inherente a cualquier ser vivo, al darse en dos poblaciones diferentes más o menos aisladas y por lo tanto con poca o ninguna de uniformización

genética, produce ligeras diferencias génicas que se van acumulando. Si el aislamiento precigótico no se ha desarrollado todavía y se produce un contacto secundario las diferencias pueden convertirse en incompatibilidades (BDM) que alteran intimamente la organización de la cromatina en los híbridos, afectando primariamente a sus características estructurales (Barbash, 2004; Bolkan, 2007; Ferree, 2009), sumadas a alteraciones de tipo regulatorio (Ranz, 2004), inestabilidad de complejos proteicos multiméricos (Barbash, 2010) y terminando con incompatibilidad total de productos, constituyéndose el aislamiento postcigótico completo. Estas causas estarían interrelacionadas, actuando una o varias en cada efecto observado y podrían traducirse también en una variación del esquema temporal del desarrollo

A nivel molecular los híbridos tendrían una variedad de productos génicos heterogéneos, algunos “intraespecíficos” normales para la especie y otros “interespecíficos” por incluir información de la otra. No olvidemos que al ser muy parecidas en el límite del proceso de especiación, la funcionalidad no tendría por que verse afectada más que levemente en un grado a menudo indetectable para nosotros, pero la fuerza de cohesión de subunidades proteicas o de unión al ADN de moduladores se encontraría en un equilibrio inestable. Al alterarse la estructura de la cromatina también los sistemas de regulación se verían afectados y tendríamos cantidades de productos diferentes a las normales (Ranz, 2004). La intensidad observable dependería de varios factores:

1. Intrínsecos:
 - a. Estructura del ADN y relaciones epistáticas: un cambio en una zona del ADN puede provocar consecuencias en dos ambitos:
 - i. Unión de productos reguladores a esa secuencia
 - ii. Funcionalidad de los productos proteicos de esa zona
 - iii. Duplicación o movilización de secuencias
 - b. Naturaleza del producto génico, si es un regulador, si forma parte de un complejo multimérico, etc, como por ejemplo la inestabilidad de un componente del apoptosoma en los procesos de desarrollo (Muro, 2006), o alteraciones en alguna pieza del complejo multimerico responsable de la compensación de dosis en *Drosophila* (Barbash, 2010)
 - c. Posición del producto en la secuencia de una determinada vía funcional metabólica o de desarrollo
 - d. Posibles sistemas de control homeostático de esa vía tomada como una red de procesos, apoyada por una cierta redundancia genética (Welch, 2004)
 - e. Localización y naturaleza cromosómica: hetero o eucromatina. Un solo cambio podría ser neutro o letal, con todas las posibilidades intermedias, según en que lugar se produzca, alterando, por ejemplo, la segregación en la mitosis (Ferree, 2009)
2. Extrínsecos:
 - a. Selección: actuaría o bien fijando nuevas posibilidades o eliminando factores comunes lesivos para el nuevo ambiente en una de las dos especie, incrementando las diferencias según el tiempo de aislamiento y las diferencias ambientales que existan
 - b. Grado de aislamiento: que determina la cantidad de flujo génico homogeneizador que se produce entre ambas poblaciones

3. Mixtos:

- a. Número de cambios: dependiente, entre otros factores, del tiempo de aislamiento

Dependiendo de la intensidad podríamos obtener esterilidad, inviabilidad o alteraciones del desarrollo producidas por sólo un factor aunque lo más común sería la combinación de todos ellos, modulados en su conjunto por el tiempo, la cantidad de flujo génico y la selección.

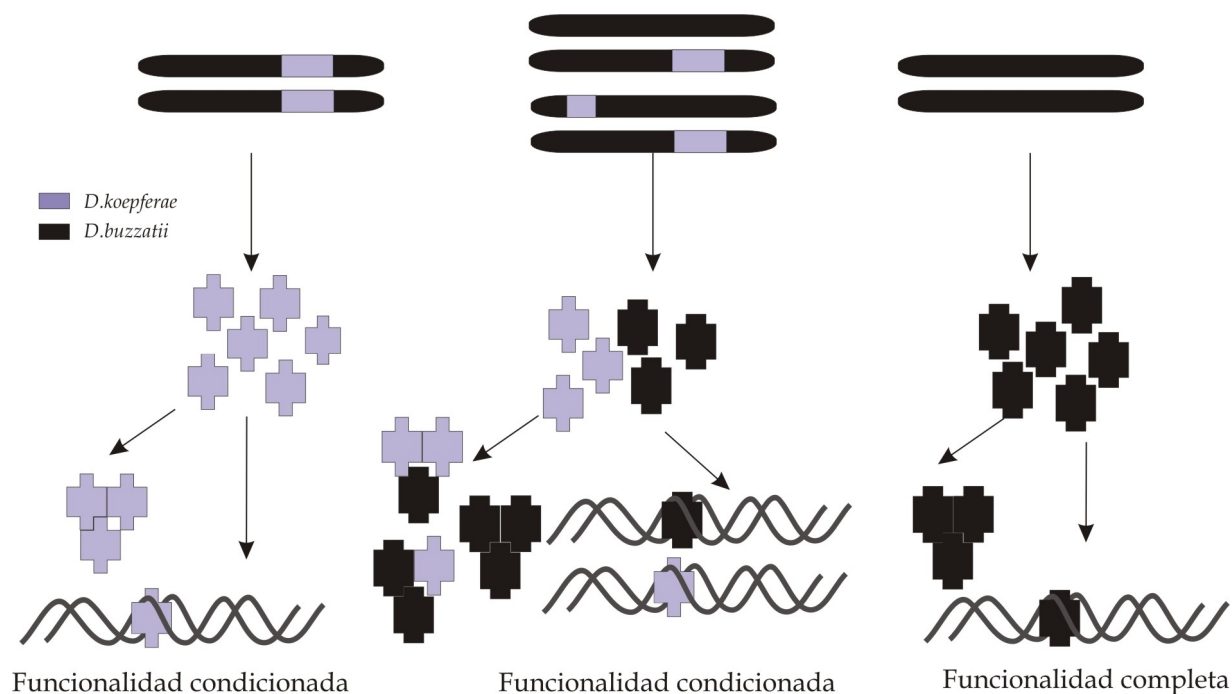
Un ejemplo sería el caso de nuestros híbridos: la introgresión provocaría a nivel molecular alteraciones del ADN o de su entorno inmediato génico, estructural o cromosómico, generando tres tipos de productos: los propios de la especie A, los de la especie B y los mixtos (distintas subunidades multiméricas), que dependiendo del fondo genético en el que se encontraran generarían fenotipos normales, condicionales o no aptos (Michalak, 2003)

- a) Ningún efecto: los productos son compatibles entre especies por no acumular cambios, no ser estos suficientemente graves o ser neutrales
- b) Efectos condicionales: las incompatibilidades se pondrían de manifiesto primero en productos génicos que participaran en líneas de regulación complejas, como la del desarrollo (*Odysseus* es parte de un homeobox-Ting, 1998), en proteínas compuestas por subunidades, en las que las uniones se verían alteradas o en la fuerza de las uniones de factores de transcripción al promotor (Michalak, 2003). Sobre todo en este último caso, cualquier divergencia ambiental respecto a un óptimo podría hacer que la estabilidad proteica, y por tanto la funcionalidad, se viera disminuida. Tal vez esa sea la explicación de nuestros datos de inviabilidad, esterilidad y desarrollo no asignables a una localización génica concreta.
- c) Efectos mayores: las incompatibilidades serían lo suficientemente graves como para aislar ambas especies. En nuestro trabajo sería el caso de las zonas resistentes al protocolo de homocigosis y en otros trabajos de los llamados “genes de especiación”, zonas de esterilidad híbrida o fragmentos de inviabilidad híbrida.

En nuestro estudio nos interesó poner de manifiesto esas diferencias que producirían una reducción de la *fitness* general, pero ¿Qué situaciones serían las más favorables para esas manifestaciones?

- Homocigosis o hemicigosis: sería el caso de nuestros experimentos de esterilidad-inviabilidad o del caso de los cromosomas sexuales. El reemplazo total de una de las informaciones haría que los productos génicos interespecíficos inestables sustituyeran a los específicos estables, y se revelarían además la naturaleza recesiva de las incompatibilidades (Presgraves, 2003; Sherman, 2014)
- Grandes cantidades de material ajeno: gran parte del genoma se volvería inestable. Sería el típico caso que conocemos como la crisis de la F₂ en cruces entre especies cercanas.
- Stress: cualquier circunstancia ambiental de tensión, como la oscilaciones de temperatura (Orr, 2004; Bolkan, 2007)) haría desestabilizarse la parte interespecífica y los efectos se harían más severos, aunque la arquitectura genética siguiera siendo la misma
- Fuerte presión evolutiva: haría que las diferencias producidas al azar fueran fijadas, con lo que el equilibrio inestable de los productos génicos interespecíficos se desplazaría hacia una

inestabilidad o una incompatibilidad de efectos incluso letales. Explicaría el efecto mayor del cromosoma X por su evolución más rápida.



Las distintas posibilidades de combinación harían que, aunque lo más común fuera que el ritmo de acumulación de incompatibilidades tardara en manifestarse en los híbridos y que en un primer momento detectemos efectos relativamente leves: deformaciones en parte de la población, retrasos en desarrollo, ligera mortalidad, etc. Salvo efectos específicos, los machos serían lo más afectado por su hemicigosis (o nuestros homocigotos transgénicos).

A mayor intensidad o número de factores afectados, también más funciones o relaciones se alterarían, sobre todo si las realiza en combinación con otros productos génicos, y provocaría un efecto multiplicativo o exponencial sobre el conjunto, como postula la hipótesis “snowball” (Presgraves, 2010(a); Sherman, 2014), que se traduciría en las anomalías habitualmente observadas en los híbridos estudiados. A medida que se acumularan más diferencias y las fuerzas de cambio funcionaran durante más tiempo, encontraríamos ya los primeros loci-barrera, que aislarían totalmente a las dos poblaciones y formarían dos especies distintas, y que no sólo tendrían que aparecer en relaciones estrictamente nucleares, si no también en la relaciones con el ADN mitocondrial o con ARN o productos maternos presentes en el ovocito, en una expresión del llamado conflicto intragenómico (Crespi, 2012)

Podría darse en pares de especies incipientes una incompatibilidad de alto grado en las primeras etapas de aislamiento o que un pequeño cambio produjese una alteración fenotípica adaptativa o ecológicamente lesiva que acelerara el proceso en un contacto secundario por intervención de la selección

Evidencias

La primera son las asinapsis cromosómicas que observamos en nuestro trabajo y que hemos usado precisamente como diagnóstico de las zonas interespecíficas. Independientemente de cómo se forme el apareamiento entre homólogos es un proceso estructural que implica la organización básica de la cromatina distinta en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. El hecho de que cualquier fragmento introgresado de una especie sobre la otra se separe, pero que en homocigosis se una de nuevo indica diferencias a nivel general en la organización cromosómica. La divergencia molecular repercutiría en una falta de reconocimiento entre homólogos que afectaría a su tasa de recombinación (Morán, 2014) y a defectos en la segregación mitótica por alteración de secuencias no codificantes de la heterocromatina (Ferree, 2009).

La cromatina se demuestra cada vez más dinámica y heterogénea. Dentro de la eucromatina se han visto amplias zonas altamente conservadas entre especies incluso en el orden de los genes, que mayormente se relacionan con desarrollo, muy empaquetadas y de replicación tardía, y otras con reordenaciones frecuentes, génicamente densas, con frecuentes duplicaciones y/o elementos repetitivos, que se asocian a evolución adaptativa (Andreynkova; 2014) y que probablemente provocarían cambios en la estructura íntima de la cromatina.

En cruces del par *mel/sim* se observa una condensación anormal en el cromosoma X de las glándulas salivares de los híbridos (Chatterjee; 2007; Barbash, 2010). Como ejemplo el factor de rescate de inviabilidad *Lhr* interactúa con la proteína HP1 de unión al ADN en zonas de heterocromatina con ADN repetitivo y parece coevolucionar con ellas, siendo estas zonas de máxima variabilidad (Presgraves, 2007). Su alteración produce alteraciones en el estado de condensación de la cromatina que se traducen en problemas en la mitosis y alteraciones en la fisiología celular en etapas muy tempranas, que recuperan la normalidad si se selecciona el fragmento que contiene *Hmr* (Bolkan, 2007; Ferree, 2009). Es concebible que al igual que pasa con estos, reguladores de otros sistemas no desarrollen o se vean dificultados en realizar su función y provoquen cualquier otro tipo de conflicto genético (Presgraves, 2007).

A mayor cromosoma afectado existiría una correlación lineal o exponencial con alteraciones de funcionamiento orgánico. Precisamente esto lo hemos observado en el efecto de fondo de las incompatibilidades que producen inviabilidad y la esterilidad parcial correlacionada fundamentalmente con la cantidad de material ajeno. El dato de que la determinación de esta correlación no sea completa probaría la intervención de otros factores de los anteriormente citados modulando las consecuencias observables. La existencia de mayor densidad de factores de esterilidad en zonas de heterocromatina y pericentroméricas (Morán, 2014) también apunta hacia esa explicación, rebajando la importancia génica en sí hacia la estructural.

Un buen ejemplo sería las regiones controladoras de la reproducción. Están sometidas a una fuerte presión selectiva, lo cual explica otra de las observaciones generales de este tipo de trabajos: la esterilidad entre híbridos se desarrolla antes que la inviabilidad. (Presgraves, 2004; Orr, 2004)

Otro ejemplo de todo el proceso se puede ver en la acción de las líneas de expresión génica en el desarrollo. Fijémonos en el proceso de pupación. En él masas celulares como las de las glándulas salivares son destruidas por apoptosis para desarrollar los nuevos tejidos. Este es un proceso controlado por el ADN donde intervienen gran número de genes y sus productos, que se encargan desde formar agrupaciones proteicas multiméricas (apoptonema) hasta controlar el inicio y desarrollo de todo el proceso. Los experimentos con mutantes para genes que se sitúan a lo largo de esa línea son coincidentes en la expresión

fenotípica de patrones alterados del desarrollo, como por ejemplo, la genitalia rotada (Morata, 2004) u ojo o ala deformado (Muro, 2006), entre otras

Nosotros obtenemos idénticas alteraciones, entre otras, pero aparecen en cualquier zona del cromosoma estudiado y en un porcentaje máximo de un 4%. Por un lado parece extraño que un fenotipo idéntico se desencadene por dos procesos absolutamente independientes coincidiendo de manera casual. Por otro lado, tampoco parece probable que precisamente cada fragmento seleccionado en nuestro experimento contenga un gen concreto relacionado con la apoptosis, situado a un nivel que produjese exactamente el mismo fenotipo y que en cualquier caso no explicaría la baja proporción de anomalías.

Independientemente hay que tener en cuenta que un producto génico puede intervenir en varios procesos. De hecho el factor *Ice*, de importancia en el control de apoptosis también se expresa en el desarrollo del testículo (Muro, 2006).

También hemos observado problemas en los testículos. Desde la más grave atrofia hasta un ligero retraso en la madurez sexual, aunque siempre asociada a una disposición en homocigosis y dependiente no tanto de la posición cromosómica como de la cantidad de material introgresado, dato importante por indicar un efecto de fondo y general, más que circunscrito a una zona específica.

Como conclusión general a todos nuestros datos, proponemos una orientación que a menudo se obvia: más que incompatibilidades en si, lo que se acumulan son los cambios en el ADN de zonas de normales con funciones ordinarias. En el proceso de interrupción de flujo génico que acompaña a las fases iniciales de la especiación estas diferencias son sometidas a selección y de ellas las positivas están sometidas a elevada presión evolutiva, con lo que observaríamos una evolución rápida de esas zonas.

Al poner en contacto dos especies cercanas que todavía pueden reproducirse, estas regiones serían las que, al diverger más rápidas, acumularían mayores diferencias, tendrían una mayor probabilidad de ser incompatibles entre si y serían candidatas a “genes de especiación” (Orr, 2004) o más apropiadamente, loci barrera (Abott, 2013)

En esencia este modelo cumpliría los condicionantes básicos que se ponen habitualmente para el proceso de especiación: los factores serían genes normales de actuación normal, evolucionarían más rápido (en ellos aparecerían antes las diferencias), estarían sujetos a selección positiva (Orr, 2004), tendrían efectos aditivos, pero cada factor tendría un efecto exponencial y seguiría una distribución de Poisson a lo largo de un cromosoma (Tao, 2003) Actualmente son prácticamente universales los estudios que, utilizando la tecnología más moderna y los protocolos más avanzados, investigan *in vitro* sobre pequeñas zonas del genoma. Es innegable que son aportaciones imprescindibles y de un alto valor. Nuestro trabajo ha empleado solamente técnicas clásicas de muy bajo coste y relativamente sencillas. Hemos obtenidos unos resultados que complementan los datos moleculares experimentado con individuos *in vivo* que con su enorme complejidad nos siguen dando sorpresas inesperadas. Tal vez sería positivo no olvidar que la última técnica no es por ello la mejor, sino que permite un punto de vista distinto sobre los mismos problemas ya planteados y que su solución pasa por el análisis de toda la información posible.

Nuestro trabajo intenta orientar las zonas cromosómicas en las que futuros estudios pueden centrarse. Es esta una tendencia que se ha desarrollado en publicaciones donde coexisten análisis cromosómicos más o menos clásicos (Sawamura, 2000). También podrían utilizarse los híbridos homocigotos como líneas estables que son en estudios moleculares que diferencien estructuras o interacciones génicas, así como posibles trabajos de analisis diferencial de transcriptoma (Assis, 2012)

A lo largo de este estudio se han mostrado variadas anomalías: unas aparentemente leves y otra que comprometían seriamente la supervivencia del individuo. Hemos intentado caracterizarlos con los medios con los que contamos. Nos hemos dado cuenta que en realidad la aparición de estas anomalías es el resultado de un proceso de alteración de origen genético producido por la inclusión de material extraño en un fondo genético que, al haber evolucionado de manera coordinada se ve desequilibrado. En el fondo no es más que la comprobación empírica del modelo sencillo y básico de Dobzhanski-Müller.

Este modelo que actualmente se adopta como explicación de partida al fenómeno de la especiación, permite explicar fenómenos como la “crisis” de la F₂ en híbridos, entre otros. De ahí muchos trabajos saltan a la búsqueda directa de “genes de especiación” como a menudo se les denomina (Orr, 2004) ya sean estos productores de inviabilidad o de esterilidad, que se consideran fenómenos más o menos independientes.

Así pues, la base de la especiación es la interrupción del flujo génico entre poblaciones. El resto del proceso no presentaría ninguna excepcionalidad. Sólo sería un suceso en el que las fuerzas de cambio genético actuarían en compartimentos aislados, al azar y por lo tanto produciendo una divergencia que se pondría de manifiesto cuando los cruces interespecíficos fueran todavía posibles en un grado mayor o menor según el número y localización de dichas divergencias.

Nos apoyamos en el hecho de que nuestros híbridos que bajo un fondo genético uniforme coevolucionado tienen fragmentos extraños de distinta localización presentan al menos una característica en común: su menor *fitness* total respecto a cualquiera de las dos especies de referencia. Aunque a lo largo de este estudio este hecho ha quedado constatado mediante parámetros objetivables, la observación subjetiva del investigador señala que incluso en los fragmentos de menor tamaño y de menor efecto, la alteración genética hace que esos individuos sean especialmente sensibles a multitud de elementos ambientales no medibles que les provoca una debilidad que hace que su mantenimiento en condiciones de laboratorio sea delicada y claramente insostenible en un ambiente natural. De hecho, aún teniendo especial mimo en la conservación de las líneas obtenidas y a pesar de encontrarse duplicadas y en un ambiente óptimo, han sufrido fluctuaciones en su número poblacional sin ninguna razón aparente. En casi todos los casos estas crisis fueron superadas pero en algún caso llevaron a su desaparición, sin causa directa que lo produjera excepto los ejemplos descritos que desencadenan esa debilidad general atribuible a su diseño genético específico, pero no achacable a una zona concreta, sino a un malfuncionamiento general difuso en combinación con una variabilidad ambiental incontrolable.

De todas maneras la obtención de estas líneas abre el campo a estudios en los que se pueda definir más la causa molecular de todas las alteraciones encontradas. Apostamos por análisis de transcriptoma en los híbridos para intentar detectar qué volumen de productos génicos se ven afectados por la introgresión. Tampoco sería descabellado el análisis del ADN mitocondrial de las cepas *D. buzzatii* SL 6 y *D. buzzatii* SL 101 white, para intentar determinar la causa del efecto materno que provoca esta última.

CONCLUSIONES

1. *D. koepferae* y *D. buzzatii* presentan diferencias significativas en parámetros asociados a la cópula como el tiempo de desarrollo testicular, el momento y duración de la cópula, la ratio de parejas con descendencia y la densidad de individuos necesarios. Esto se traduce en un fuerte aislamiento precigótico expresado en el rechazo de las hembras de *D. koepferae*, poblacionalmente más heterogéneas que *D. buzzatii*
2. Se pueden colocar fragmentos de prácticamente todo el cromosoma 4 de *D. koepferae* en *D. buzzatii*, en homocigosis o heterocigosis *trans*, sin efectos de inviabilidad o esterilidad absoluta, con sólo dos excepciones locales (4B3-C2 y 4G3) que resisten la puesta en homocigosis y que producen letalidad en adultos. Sin embargo la introgresión de fragmentos produce retraso en el desarrollo testicular, frecuentes desviaciones de ratio sexual 1:1 (inviabilidad sexo específica) y baja productividad (inviabilidad respecto a salvaje), dependiendo de:
 - a. La arquitectura cromosómica: máxima en homocigotos, mínima en heterocigotos simples e intermedia en los dobles.
 - b. la cantidad de cromosoma ajeno, en correlación directa. Se calcula que aproximadamente un 15% de cromosoma ya produce efectos serios de atrofia testicular en el 30% de los machos
3. Existe un efecto materno señalado por la mortalidad de machos en los cruces de machos introgresados en homocigosis con hembras *D. buzzatii(w)*, no observada con *D. buzzatii SL*. El comportamiento no recíproco de los cruzamientos de homocigotos entre si sugiere un efecto similar, pero mucho más débil.
4. La inviabilidad observada se produce mayormente en el sexo heterogamético y en una fase temprana del desarrollo, confirmado por el comportamiento en general idéntico de larvas y adultos y por el efecto materno observado. Existen también pequeños efectos local/parciales de inviabilidad en fase de pupa o de mortalidad en el sexo homogamético
5. A mayor cantidad de cromosoma de *Drosophila koepferae* en *Drosophila buzzatii* se produce un mayor porcentaje, pequeño pero estable, de individuos con variadas alteraciones en el desarrollo, que no se pueden fijar y son independientes de la temperatura de cultivo, si bien ésta sí afecta a la mortalidad de los híbridos. Por otro lado, la introgresión de la región 4 B3-C2 se asocia a una elevada frecuencia de alas con vena L5 incompleta o ausente.
6. Los híbridos presentan en su conjunto una disminución de la *fitness* medida como producción relativa de descendencia respecto a la especie *D. buzzatii*. Esta disminución está relacionada con la cantidad de material introgresado y la arquitectura cromosómica aunque en fragmentos pequeños la heterosis puede enmascarar este efecto.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Abbott, Michael K.; Lengyel, Judith A. (1991) *Embryonic Head Involution and Rotation of Male Terminalia Require the Drosophila Locus head involution defective*; Genetics; 129
- 2.- Abbott, R.; Albach, D.; Ansell, S.; Arntzen, J.W.; Zinner, D. (2013) *Hybridization and speciation*; J.Evol.Biol.; 26
- 3.- Albarrán-Lara, Ana Luisa; Mendoza-Cuenca, Luis; Valencia-Avalos, Susana; González-Rodríguez; Oyama, Ken(2010) *Leaf fluctuating asymmetry increase with hybridization and introgression between Quercus magnoliifolia and Quercus resinosa(Fagaceae) through an altitudinal gradient in Mexico*; Int.J.Plant.Sci.; 171
- 4.- Andreyenkova, Natalya G.; Kolesnikova, Tatyana D.; Makunin, Igor; Pokholkova, Galina V.; Zhimulev, Igor F.(2013) *Late Replication Domains Are Evolutionary Conserved in the Drosophila Genome*; PLOS; 8(12)
- 5.- Araripe, Luciana; Montenegro, Horacio; Lemos, Bernardo; Hartl, Daniel L.(2010) *Fine-scale genetic mapping of a hybrid sterility factor between Drosophila simulans and D. mauritiana: the varied and elusive functions of "speciation genes"*; BCM Evolutionary Biology; 10
- 6.- Ashburner, Michael (1989) *Drosophila: A Laboratory Handbook*; Cold Spring Harbor;
- 7.- Assis, Raquel; Zhou, Qi; Bachtrog, Doris (2012) *Sex-Biased Transcriptome Evolution in Drosophila*; Genome Biol. Evol.; 4
- 8.- Baehrecke, Eric H. (2002) *How death shapes life during development*; Nature Reviews: Molecular Cell Biology; 3
- 9.- Barbash, Daniel A. (2010) *Ninety Years of Drosophila melanogaster Hybrids*; Genetics; 186
- 10.- Barbash, Daniel A. (2010) *Genetic Testing of the Hypothesis That Hybrid Male Lethality Results From a Failure in Dosage Compensation*; Genetics; 184
- 11.- Beasley, Anna E.; Bonisoli-Alquati, Andrea; Mousseau, Timothy A. (2013) *The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: A meta-analysis*; Ecological Indicators; 30
- 12.- Benítez, Sergio; Sosa, Claudia; Tomasini, Nicolás; Macías, Ana(2010) *Both JNK and apoptosis pathways regulate growth and terminalia rotation during Drosophila genital disc development*; Int.J.Dev.Biol.; 54
- 13.- Beukeboom, Leo W.; Koevoets, Tosca; Morales, Hernán E.; Ferber, Steven; Van de Zande, Louis(2015) *Hybrid incompatibilities are affected by dominance and dosage in the haplodiploid wasp Nasonia*; Front. Genet.; 6(140)
- 14.- Bolkan, Bonnie J.; Booker, Ronald; Goldberg, Michael L.; Barbash, Daniel A.(2007) *Developmental and Cell Cycle Progression Defects in Drosophila Hybrid Males*; Genetics; 177
- 15.- Brideau, Nichola J.; Flores, Heather A.; Wang, Jun; Maheshwari, Shamoni; Barbash, Daniel A.(2006) *Two Dobzhansky-Muller Genes Interact to Cause Hybrid Lethality in Drosophila*; Science; 314

- 16.- Bruckner, Robert M.; Bordenstein, Seth R. (2012) *Speciation by symbiosis*; Trends in Ecology and Evolution; 27(8)
- 17.- Butlin, Roger; DeBelle, Alan; Kerth, Claudius; Snook, Ronda R.; Beukeboom, Leo R.(2012) *What do we need to know about speciation?*; Trends in Ecology and Evolution; 27
- 18.- Carreira, Valeria P.; Soto, Ignacio M.; Fanara, Juan J.; Hasson, Esteban(2008) *A study of wing morphology and fluctuating asymmetry in interspecific hybrids between Drosophila buzzatii and D. koepferae*; Genetica; 133
- 19.- Carroll, Sean B. (2006) *Endless Forms Most Beautiful*; Weidenfield & Nicolson;
- 20.- Carvajal, Antonio R.; Gandarela, Manuel R.; Naveira, Horacio F. (1996) *A three-locus system of interespecific incompatibility underlies male inviability in hybrids between Drosophila buzzatii and D. koepferae*; Genetica; 98
- 21.- Carvajal, Antonio R. (1999) *Base genética de la inviabilidad en híbridos de las especies gemelas Drosophila koepferae y Drosophila buzzatii*; Tesis doctoral;
- 22.- Chang, Chin-Wen; Nashchekin, Dmitri; Wheatley, Lucy; Irion, Uwe; St. Johnston, Daniel(2011) *Anterior-Posterior Axis Specification in Drosophila Oocytes: Identification of Novel bicoid and oskar mRNA Localization Factors*; Genetics; 188
- 23.- Charlesworth, D.; Charlesworth, B.; Marais, G. (2005) *Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes*; Heredity; 95
- 24.- Chatterjee, R.N.; Chatterjee, A.; Pal, A.; Pal-Bhadra, M.(2007) *Drosophila simulans Lethal hybrid rescue mutation(Lhr) rescues inviable hybrids by restoring X chromosomal dosage compensation and causes fluctuating asymmetry of development*; Journal of Genetics; 86(3)
- 25.- Colombani, Julien; Anderson, Ditte S.; Léopold, Pierre (2012) *Secreted Peptide Dilp8 Coordinates Drosophila Tissue Growth with Developmental Timing*; Science; 336
- 26.- Coyne, Jerry A.; Oyama, Ryan (1995) *Localization of pheromonal sexual dimorphism in Drosophila melanogaster and its effect on sexual isolation*; Proc. Natl. Acad. Sci.; 92
- 27.- Crespi, Bernard; Nosil, Patrik (2012) *Conflictual speciation: species formation via genomic conflict*; Trends in Ecology and Evolution;
- 28.- Cruz, Cristina; Glavic, Alvaro; Casado, Mar; Celis, José F.(2009) *A Gain-of-Function Screen Identifying Genes Required for Growth and Pattern Formation of the Drosophila melanogaster Wing*; Genetics; 183
- 29.- Currat, Mathias; Ruedi, Manuel; Petit, Rémy; Excoffier, Laurent(2008) *The hidden side of invasions: massive introgression by local genes*; Evolution; 62
- 30.- Cuykendall, Tawny; Satyaki, P.; Ji, Shuqing; Barbash, Daniel A.; et al.(2014) *A Screen for F1 Hybrid Male Rescue Reveals No Major-Effect Hybrid Lethality Loci in the Drosophila melanogaster Autosomal Genome*; Genes, genomes, genetics; 4

- 31.- Daish, Tasman J.; Mills, Kathryn; Kumar, Sharad (2004) *Drosophila Caspase DRONC Is Required for Specific Developmental Cell Death Pathways and Stress-Induced Apoptosis*; Dev. Cell; 7
- 32.- De Queiroz, Kevin (2007) *Species Concepts and Species Delimitation*; Systematic Biology; 56
- 33.- Debat, Vicent; Bloyer, Sébastien; Faradji, Floria; Gidaszewski, Nelly; Peronnet, Frédérique(2011) *Developmental Stability: A Major Role for Cyclin G in Drosophila melanogaster*; PLOS; 7
- 34.- Desmontis, Ditte; Pertoldi, C.; Passamonti, Marco; Scali, Valerio(2010) *Increased Fluctuating Asymmetry in a Naturally Occurring Hybrid Zone between the Stick Insects Bacillus Rossius Rossius and Bacillus Rossius Redtenbacheri*; Journal of Insect Science; 10
- 35.- Evgenev, Michael B.; Zelenstsova, Helena; Poluectova, Helena; Lyozin, George T.; Kidwell, Margaret, G.(2000) *Mobile elements and chromosomal evolution in the virilis group of Drosophila*; Pnas; 97(21)
- 36.- Ezaz, T.; O'Meally, D.; Marshall Graves, J.A.; Georges, A.(2010) *Sex Chromosome Evolution in Lizards:Independent Origins and Rapid Transitions*; Cytogenetic and Genome Research; 127
- 37.- Fanara, Juan J.; Fontdevila, A.; Hasson, Esteban (1999) *Oviposition preference and life history traits in cactophilic Drosophila koepferae and D. buzzatii in association with their natural host*; Evolutionary Ecology; 13
- 38.- Faradji, Floria; Bloyer, Sébastien; Dardalhon-Cuménal, Delphine; Randsholt, Neel B.; Peronnet, Frédérique(2011) *Drosophila melanogaster Cyclin G coordinates cell growth and cell proliferation*; Cell Cycle; 105
- 39.- Ferree, Patrick M.; Barbash, Daniel A. (2009) *Species-Specific Heterochromatin Prevents Mitotic Chromosome Segregation to Cause Hybrid Lethality in Drosophila*; PLoS Biology; 7(10)
- 40.- Fontdevila, Antonio; Wasserman, Marvin; Naveira, Horacio F.; Ruiz, Alfredo(1988) *Drosophila koepferae: a new member of the Drosophila serido(Diptera: Drosophilidae) Superespecies taxon*; Entomol. Soc. Am.; 81(3)
- 41.- Garelli, Andres; Gontijo, Alisson M.; Miguela, Veronica; Caparros, Esther; Dominguez, María(2012) *Imaginal Disc Secrete Insulin-like Peptide 8 to Mediate Plasticity of Growth and Maturation*; Science; 336
- 42.- Garnier, Stephane; Gidaszewski, Nelly; Charlot, Maryline; Rasplus, Jean-Ives; Alibert, Paul(2006) *Hybridization, developmental stability, and functionality of morphological traits in the ground beetle Carabus solieri(Coleoptera, Carabidae)*; Biological Journal of the Linnean Society; 89
- 43.- Gavin-Smith, Jackie; Matute, Daniel R. (2013) *Embryonic lethality leads to hybrid male inviability in hybrids between Drosophila melanogaster and D. santomea*; Ecology and Evolution; 3(6)
- 44.- Gérard, Pierre R.; Presgraves, Daven C. (2012) *Abundant genetic variability in Drosophila simulans for hybrid female lethality in interspecific crosses to Drosophila melanogaster*; Genet. Res. Camb.; 94

- 45.- Gerhold, Abigail R.; Richter, Daniel J.; Yu, Albert S.; Hariharan, Iswar K.(2011) *Identification and Characterization of Genes Required for Compensatory Growth in Drosophila*; Genetics; 189
- 46.- Gilber, Scott F. (2003) *Biología del desarrollo*; Ed. Panamericana;
- 47.- Gilbert, Jean-Michael; Peronnet, Frédérique; Schötterer, Christian (2007) *Phenotypic Plasticity in Drosophila Pigmentation Caused by Temperature Sensitivity of a Chromatin Regulator Network*; PLOS Genetics; 3(2)
- 48.- Gómez, Gloria A.; Hasson, Esteban (2003) *Transpecific Polymorphisms in an Inversion Linked Esterase Locus in Drosophila buzzatii*; Mol. Biol. Evol.; 20
- 49.- González, Josefa; Nefedov, Michael; Bosdet, Ian; Casals, Ferran; Ruiz, Alfredo(2006) *A BAC-based physical map of the Drosophila buzzatii genome*; Genome; 15
- 50.- Gorfinkiel, Nicole; Sánchez, Lucas; Guerrero, Isabel (2003) *Development of the Drosophila genital disc requires interactions between its segmental primordia*; Development; 130
- 51.- Graham, John H.; Felley, James D. (1984) *Genomic coadaptation and development stability within introgressed populations of Enneacanthus gloriosus and E. obesus(Pisces, Centrarchidae)*; Evolution; 39
- 52.- Green, M.M. (2010) *2010: A Century of Drosophila Genetics Through the Prism of the white Gene*; Genetics; 184
- 53.- Gursky, Vitaly V.; Surkova, Svetlana Yu.; Samsonova, María G. (2012) *Mechanisms of developmental robustness*; Biosystems; 109
- 54.- Haldane, J.B.S. (1922) *Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals*; Journal of Genetics; 12(2)
- 55.- Hausdorf, Bernhard (2011) *Progress toward a general species concept*; Evolution; 65
- 56.- Higgin, Megan; Chenoweth, Steve; Blows, Mark W. (2000) *Natural Selection and the Reinforcement of Mate Recognition*; Science; 290
- 57.- Holloway, David M.; Lopes, Francisco J. P.; da Fontoura Costa, Luciano; Travençolo, Bruno A. N.; Spirov, Alexander V.(2010) *Gene Expression Noise in Spatial Patterning: hunchback Promoter Structure Affects Noise Amplitude and Distribution in Drosophila Segmentation*; Plos Computational Biology; 7(2)
- 58.- Jennings, Jackson H.; Etges, William J.; Schmitt, Thomas; Hoikkala, Anneli(2014) *Cuticular hydrocarbons of Drosophila montana: Geographic variation,sexual dimorphism and potential roles as pheromones*; Journal of Insect Physiology; 61
- 59.- Jonhson, Norman A.; Hollocher, Hope; Noonburg, Erik; Wu, Chung-I(1993) *The effects of interespecific Y chromosome replacements on hybrid sterility within the Drosophila simulans clade*; Genetics; 135
- 60.- Kanesaki, Takuma; Hirose, Susumu; Grosshans, Joerg; Fuse, Naoyuki(2013) *Heterotrimeric G protein signaling governs the cortical stability during apical constriction in Drosophila gastrulation*; Mechanism of Development; 130

- 61.- Kikuchi, Yoshitomo; Hosokawa, Takahiro; Nikoh, Naruo; Meng, Xian-Ying; Fukatsu, Takema(2009) *Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs*; BCM Biology;
- 62.- Koevoets, K.; Beukeboom, L.W. (2009) *Genetics of postzygotic isolation and Haldane's rule in haplodiploids*; Heredity; 102
- 63.- Kugler, Jan-Michael; Lasko, Paul (2009) *Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during Drosophila oogenesis*; Fly; 3(1)
- 64.- Kuranaga, Erina; Matsunuma, Takayuki; Kanuka, Hirotaka; Takemoto, Kiwamu; Miura, Masayuki(2011) *Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in Drosophila male terminalia*; Development; 138
- 65.- Labrador, M.; Naveira, Horacio F.; Fontdevila, Antonio (1980) *Genetic Mapping of the Adh Locus in the Repleta Group of Drosophila by in situ Hybridization*; Journal of Heredity; 81
- 66.- Lasko, Paul (2012) *mRNA Localization and Translational Control in Drosophila Oogenesis*; Cold Spring Harb Perspect Biol;
- 67.- Lens, Luc; Van Dongen, Stefan; Kark, Salit; Mathysen, Erik(2002) *Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies?*; Biol. Rev.; 77
- 68.- Lim, Jonhg K.; Simmons, Michael KJ. (1994) *Gross Chromosome Rearrangements Mediated by Trasposable Elements in Drosophila melanogaster*; BioEssays; 16(4)
- 69.- Link, Nichole; Chen, Po; Lu, Wan-Ji; Pogue, Kristi; Abrams, John M.(2007) *A collective form of cell death requires homeodomain interacting protein kinase*; The Journal of Cell Biology;
- 70.- Liu, Zhiyong; Moore, Paul H.; Ma, Hao; Ackerman, Christine M.; Ming, Ray(2004) *A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution*; Nature; 427
- 71.- Llorente, Jorge; Michán, Layla (2000) *El concepto de especie y sus implicaciones para el desarrollo de inventarios y estimaciones en biodiversidad*; PriBes-2000; 1
- 72.- Lucchesi, John C.; Kelly, William G.; Panning, Barbara (2005) *Chromatin Remodeling in Dosage Compensation*; Ann. Rev. Gen.; 39
- 73.- Machado, L.P.B.; Castro, J.P.; Madi-Ravazzi, L. (2002) *Evaluation of the courtship and of the hybrid male sterility among Drosophila buzzatii cluster species(Dipterqa, Drosophilidae*; Braz. J. Biol.; 62
- 74.- Machado, L.P.B.; Madi-Ravazzi, L.; Tadei, W. J. (2006) *Reproductive relationships and degree of synapsis in the polytene chromosomes of the Drosophila buzzatii especies cluster*; Braz. J. Biol.; 66
- 75.- Macías, Ana; Romero, Nuria M.; Martín, Francisco; Suárez, Leonardo; Morata, Ginés(2004) *PVF1/PVR signaling and apoptosis promotes the rotation and dorsal closure of the Drosophila male terminalia*; Int.J.Dev.Biol.; 48

- 76.- Manfrin, Maura Helena; De Brito, R.O.A.; Sene, F.M. (2001) *Systematics and Evolution of the Drosophila buzzatii*(Diptera: Drosophilidae) Cluster Using mtDNA; Ann. Entomol. Soc. Am.; 94
- 77.- Manfrin, Maura Helena; Melo Sene, Fabio (2006) *Cactophilic Drosophila in South America: a model for evolutionary studies*; Genetics; 126
- 78.- Mank, Judith E.; Hosken, David J.; Wedell, Nina (2011) *Some Inconvenient Truths about Sex Chromosome Dosage Compensation and the Potential Role of Sexual Conflict*; Evolution;
- 79.- Marín, Ignacio (1996) *Genetic Architecture of Autosome-Mediated Hybrid Male Sterility in Drosophila*; Genetics; 142
- 80.- Maside, Xulio R.; Naveira, Horacio F. (1996) *On the difficulties of discriminating between major and minor hybrid male sterility factors in Drosophila by examining the segregation ratio of sterile and fertile sons in backcrossing experiments*; Heredity; 77
- 81.- Maside, Xulio R.; Naveira, Horacio F. (1996) *A polygenic basis of hybrid sterility may give rise to spurious localizations of major sterility factors*; Heredity; 77
- 82.- Matute, Daniel R.; Butler, Ian A.; Turissini, David A.; Coyne, Jerry A.(2010) *A Test of the Snowball Theory for the Rate of Evolution of Hybrid Incompatibilities*; Science; 329
- 83.- Matute, Daniel R.; Gavin-Smith, Jackie (2014) *Fine Mapping of Dominant X-Linked Incompatibility Alleles in Drosophila Hybrids*; PLOS Genetics; 10(4)
- 84.- Maumus, Florian; Fiston-Lavier, Anna-Sophie; Quesneville, Hadi (2015) *Impact of transposable elements on insect genomes and biology*; Current opinion in Insect Science; 7
- 85.- Mayden, R.L. (1997) *A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem*; Chapman & Hall;
- 86.- Mayden, R.L. (1999) *Consilience and a Hierarchy of Species Concepts: Advances Toward Closure on the Species Puzzle*; Journal of Nematology; 31
- 87.- Mayr, Ernst (1992) *Una larga controversia: Darwin y el darwinismo*; Drakontos;
- 88.- Meiklejohn, Colin D.; Coolon, Joseph D.; Hartl, Daniel L.; Wittkopp, Patricia(2014) *The roles of cis- and trans-regulation in the evolution of regulatory incompatibilities and sexually dimorphic gene expression*; Genome Research; 24
- 89.- Michalak, Pawel; Noor, Mohamed A.F. (2003) *Genome-Wide Patterns of Expression in Drosophila Pure Species and Hybrid Males*; Mol. Biol. Evol.; 20
- 90.- Mishler, Brent D.; Brandon, Robert N. (1987) *Individuality, Pluralism, and the Phylogenetic Species Concept*; Biology and Philosophy; 2
- 91.- Morán, Tomás; Fontdevila, A. (2014) *Genome-Wide Dissection of Hybrid Sterility in Drosophila Confirms a Polygenic Threshold Architecture*; Journal of Heredity;

- 92.- Moyle, Leonie C.; Nakazato, Takuya (2010) *Hybrid Incompatibility "Snowballs" Between Solanum Species*; Science; 329
- 93.- Muro, Israel; Berry, Deborah L.; Huh, Jun R.; Chen, Chun Hong; Hay, Bruce A. Hay (2006) *The Drosophila caspase Ice is important for many apoptotic cell deaths for spermatid individualization, a nonapoptotic process*; Development; 133
- 94.- Navarro, Caryn; Lehman, Ruth; Morris, Jason (2001) *Oogenesis: Setting one sister above the rest*; Current Biology; 11
- 95.- Naveira, Horacio F.; Fontdevila, A. (1986) *The evolutionary history of Drosophila buzzatii. XII. The genetic basis of sterility in hybrids between D. buzzatii and its sibling D. serido from Argentina*; Genetics; 114
- 96.- Naveira, Horacio F.; Pla, C.; Fontdevila, Antonio (1986) *The evolutionary history of Drosophila buzzatii XI. A new method for cytogenetic localisation based on asynapsis of polytene chromosomes in interspecific hybrids of Drosophila*; Genetica; 71
- 97.- Naveira, Horacio F.; Fontdevila, A. (1991) *The evolutionary history of D. buzzatii. XXII. Chromosomal and genic sterility in male hybrids of Drosophila buzzatii and Drosophila koepferae*; Heredity; 66
- 98.- Naveira, Horacio F.; Fontdevila, A. (1991) *The evolutionary history of D. buzzatii. XXI. Cumulative action of multiple sterility factors on spermatogenesis in hybrids of D. buzzatii and D. koepferae*; Heredity; 67
- 99.- Naveira, Horacio F. (1992) *Location of X-linked polygenic effects causing sterility in male hybrids of Drosophila simulans and D. mauritiana*; Heredity; 68
- 100.- Naveira, Horacio F.; Rodríguez Maside, Xulio (1998) *The Genetics of Hybrid Male Sterility in Drosophila*; Endless Forms;
- 101.- Naveira, Horacio F. (2003) *On the relative roles of faster-X evolution and dominance in the establishment of intrinsic postzygotic isolating barriers*; Genetica; 118
- 102.- Naztke, Jeanette; Kiger, John A.; Green, M.M. (2008) *Bursicon Signaling Mutation Separates the Epithelial-Mesenchymal Transition From Programmed Cell Death During Drosophila melanogaster Wing Maturation*; Genetics; 180
- 103.- Neto-Silva, Ricardo M.; Wells, Brent S.; Johnston, Laura A. (2009) *Mechanisms of growth and homeostasis in the Drosophila wing*; Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.; 25
- 104.- Noor, Mohamed A.; Feder, Jeffrey L. (2006) *Speciation genetics: evolving approaches*; Nature Reviews: Genetics; 7
- 105.- Novicic, Z.K.; Stamenkovic-Radak, M.; Pertoldi, C.; Jeli, M.; Andjelkovic, M. (2011) *Heterozygosity maintains developmental stability of sternopleural bristles in Drosophila subobscura interpopulation hybrids*; Journal of Insect Science; 11

- 106.- Nüsslein-Volhard, Christiane; Frohnhofer, Hans F.; Lehman, Ruth (1987) *Determination of Anteroposterior Polarity in Drosophila*; Science; 238
- 107.- Oliveira, D.S.; Manfrin, Maura H.; Sene, F.M.; Jackson, Larry L.; Etges, William J. (2011) *Variations on a theme: diversification of cuticular hydrocarbons in a clade of cactophilic Drosophila*; BMC Evolutionary Biology; 11
- 108.- Oliveira, D.S.; Almeida, F.C.; O'Grady, P.M.; Armella, M.A.; Etges, W.J. (2012) *Monophyly, divergence times, and evolution of host plant use inferred from a revised phylogeny of the Drosophila repleta species group*; Mol. Phylogenet. Evol.;
- 109.- Orr, H.A. (1996) *Dobzhansky, Bateson, and the Genetics of Speciation*; Genetics; 144
- 110.- Orr, H.A.; Masly, John P.; Presgraves, Daven C. (2004) *Speciation Genes*; Current opinion in genetics & Development; 14
- 111.- Pal Bhadra, Manika; Bhadra, Utpal; Birchler, James (2006) *Misregulation of Sex-Lethal and Disruption of Male-Specific Lethal Complex Localization in Drosophila Species Hybrids*; Genetics; 174
- 112.- Palmer, Richard A.; Strobeck, Curtis (1992) *Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: Implications of non-normal distributions and power statistical tests*; Acta Zool. Fennica; 191
- 113.- Pastor Pareja, Juan Carlos; Martín Blanco, Enrique; García-Bellido, Antonio (2006) *Eversión y cierre de los discos imaginales*; Investigación y Ciencia;
- 114.- Phadnis, Nitin; Orr, Allen H. (2009) *A Single Gene Causes Both Male Sterility and Segregation Distortion in Drosophila Hybrids*; Science; 323
- 115.- Piccinali, Romina; Aguadé, Montserrat; Hasson, Esteban (2004) *Comparative Molecular Population Genetics of the Xdh Locus in the Cactophilic Sibling Species Drosophila buzzatii and D. koepferae*; Mol. Biol. Evol.; 21
- 116.- Presgraves, Daven C. (2003) *A fine-scaled Genetic Analysis of Hybrid Incompabilities in Drosophila*; Genetics; 163
- 117.- Presgraves, Daven C. (2007) *Speciation Genetics: Epistasis, Conflict and the Origin of Species*; Current Biology; 17(4)
- 118.- Presgraves, Daven C. (2010) *Speciation Genetics: Search for the Missing Snowball*; Current Biology; 20
- 119.- Presgraves, Daven C. (2010) *The molecular evolutionary basis of species formation*; Nature Reviews: Genetics;
- 120.- Ranz, Jose M^a; Namgyal, Kalsang; Gibson, Greg; Hartl, Daniel L. (2004) *Anomalies in the Expression Profile of Interspecific Hybrids of Drosophila melanogaster and Drosophila simulans*; Genome Research; 14
- 121.- Rego, Carla; Matos, Margarida; Santos, Mauro (2006) *Symmetry breaking in interespecific Drosophila hybrids is not due to developmental noise*; Evolution; 60(4)

- 122.- Ren, Nan; Zhu, Chunming; Lee, Haeryn; Adler, Paul N. (2005) *Gene Expression During Drosophila Wing Morphogenesis and Differentiation*; Genetics; 171
- 123.- Rice, William R. (1989) *Analizyng tables of stadistical test*; Evolution; 43
- 124.- Rice, William R. (1996) *Evolution of the Y sex chromosome in animals*; BioScience; vol. 46 n°5
- 125.- Riede, Isolde; Renz, Manfred (1983) *Study on the somatic pairing of polytene chromosomes*; Chromosoma; 88
- 126.- Rova, Emma; Björklund, Mats (2011) *Can Preference for Oviposition Sites Initiate Reproductive Isolation in Callosobruchus maculatus?*; PLOS;
- 127.- Ruiz, Alfredo; Naveira, Horacio F.; Fontdevila, Antonio (1984) *La historia evolutiva de Drosophila buzzatii: aspectos citogenéticos de su polimorfismos cromosómicos*; Genetica Ibérica; 36
- 128.- Ruiz, Alfredo; Wasserman, Marvin (1992) *Evolutionary cytogenetics of the Drosophila buzzatii species complex*; Heredity; 70
- 129.- Sánchez, Lucas; Gorfinkiel, Nicole; Guerrero, Isabel (2001) *Sex determination genes control the development of the Drosophila genital disc, modulating the response to Hedgehog, Wingless and Decapentaplegic signals*; Development; 128
- 130.- Sawamura, K.; Davis, A. W.; Wu, Chung-I (2000) *Genetic Analysis of speciation by means of introgression into Drosophila melanogaster*; Pnas; 35582
- 131.- Schilthuizen, M.; Giesber, MCWG; Beukeboom, Leo W. (2011) *Haldane's rule in the 21st century*; Heredity; 107
- 132.- Seehausen, Ole; Butlin, Roger; Keller, Irene; Warner, Catherine E.; Saetre, Glen-Peter (2014) *Genomics and the origin of species*; Nature Reviews: Genetics; 15
- 133.- Sherman, Natasha A.; Victorine, Anna; Wang, Richard J.; Moyle, Leonie (2014) *Interspecific Tests of Allelism Reveal the Evolutionary Timing and Pattern of Accumulation of Reproductive Isolation Mutations*; PLOS Genetics; 10(9)
- 134.- Soto, Ignacio M.; Carreira, Valeria P.; Fanara, Juan J.; Hasson, Esteban (2007) *Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affect genital morphology in two Drosophila sibling species and their hybrids*; BMC Evolutionary Biology; 7
- 135.- Soto, Ignacio M. (2012) *Aedeagal Divergence in Sympatric Populations of Two Sibling Species of Cactophilic Drosophila (Diptera: Drosophilidae): Evidence of Character Displacement?*; Neotrop. Entomol.; 41
- 136.- Soto, Ignacio M.; Carreira, Valeria P.; Corio, Cristian; Padró, Julián; Hasson, Esteban (2014) *Differences in Tolerance to Host Cactus Alkaloids in Drosophila koepferae and D. buzzatii*; PLOS; 9

- 137.- Tadros, Wael; Lipshitz, Howard D. (2009) *The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts*; Development; 136
- 138.- Takahashi, Kazuo H.; Okada, Yasukazu; Teramura, Kouhei (2011) *Genome-Wide Deficiency Mapping of the Regions Responsible for Temporal Canalization of the Developmental Processes of Drosophila melanogaster*; Journal of Heredity; 102
- 139.- Tao, Yun; Chen, Sining; Hartl, Daniel,L.; Laurie, Cathy C. (2003) *Genetic Dissection of Hybrid Incompatibilities Between Drosophila simulans and D. Mauritiana. I Differential accumulation of Hybrid Male Sterility Effects on the X and Autosomes*; Genetics; 164
- 140.- Ting, Chay-Ti; Tsaur, Shun-Chern; Wu, Mao-Lien; Wu, Chung-I (1998) *A Rapidly Evolving Homeobox at the Site of a Hybrid Sterility Gene*; Science; 282
- 141.- Trotta, V.; Pertoldi, C.; Rudoy, A.; Manenti, T; Guerra, D. (2010) *Thermal plasticity of wing size and shape in Drosophila melanogaster, D. simulans and their hybrids*; Climate Research; 43
- 142.- Tsujino, Masahiro; Takahashi, Kazuo H. (2012) *Natural genetic variation in fluctuating asymmetry of wing shape in Drosophila melanogaster*; Ecological research; 27(1)
- 143.-Turelli, Michael; Orr, H.Allen (1995) *The Dominance Theory of Haldane's Rule*; Genetics, 140
- 144.- Uller, Tobias; Pen, Ido; Wapstra, Erik; Beukeboom, Leo W.; Komdeur, Jan (2007) *The evolution of sex ratios and sex-determining systems*; Trends in Ecology and Evolution; 805
- 145.- Verhulst, Eveline C.; van de Zande, Louis; Beukeboom, Leo W. (2010) *Insect sex determination: it all evolves around transformer*; Current opinion in genetics & Development; 20
- 146.- Walker, Jeffrey J.; Lee, Karin K.; Desai, Rushin N.; Erickson, Jame W. (2000) *The Drosophila melanogaster Sex Determination Gene sisA Is Required in Yolk Nuclei for Midgut Formation*; Genetics; 155
- 147.- Wang, Charlotte; Lehmann, Ruth (1991) *Nanos Is the Localized Posterior Determinant in Drosophila*; Cell; 66
- 148.- Wang, Yu-Chiun; Khan, Zia; Kaschube, Matthias; Wieschaus, Eric (2013) *Differential positioning of adherens junctions is associated with initiation of epithelial folding*; Nature; 484
- 149.- Wasserman, Marvin; Fontdevila, A.; Ruiz, Alfredo (1983) *Potential Gene Exchange Between South American Drosophila Species, with Description of a New Species in the D. repleta(Diptera: Drosophilidae) Group*; Ann. Entomol. Soc. Am.; 76
- 150.- Weissing, Franz J.; Edelaar, Pim; van Doorn, G. Sander (2011) *Adaptive speciation theory: a conceptual review*; Behav. Ecol. Sociobiol.; 65
- 151.- Welch, John J. (2004) *Accumulating Dobzhansky-Muller incompatibilities:reconciling theory and data*; Evolution; 58
- 152.- Werren, John H.; Beukeboom, Leo W. (1998) *Sex Determination, Sex Ratios, and Genetic Conflict*; Ann. Rev. Ecol. Syst.; 29

- 153.- Wharton, L.T. (1942) *Analysis of the repleta group of Drosophila*; Oxford Univ. Texas Publ; 97(6)
- 154.- Wu, Chung-I; Ting, Cchau-Ti (2004) *Genes and speciation*; Nature Reviews: Genetics; 5
- 155.- Zaessinger, Sophie; Busseau, Isabelle; Simonelig, Martine (2006) *Oskar allows nanos mRNA translation in Drosophila embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4*; Development; 133
- 156.- Zhang, Linbin; Sun, Tianai; Woldehellasse, Fitsum; Xiao, Hailian; Tao, Yun (2015) *Sex Ratio Meiotic Drive as a Plausible Evolutionary Mechanism for Hybrid Male Sterility*; PLOS Genetics; 11(3)
- 157.- Zhang,, Wenli; Wang, Xiue; Yu, Qingyi; Ming, Ray; Jiang, Jiming (2008) *DNA methylation and heterochromatinization in the male-specific region of the primitive Y chromosome of papaya*; Genome Research; 18
- 158.- Zhimulev, I.F.; Belyaeva, E.S.; Semeshin, V.F.; Koryakov, D.E.; Andreyeva, E.N. (2004) *Polytene Chromosomes: 70 Years of Genetic Research*; Int. Rev. Cyt; 241
- 159.- Zhimulev, I.F.; Koryalov, Dmitry E. (2009) *Polytene Chromosomes*; Encyclopedia of Life Sciences

ANEXO

Se presentan a continuación los datos totales de los recuentos con agrupamiento mínimo

Cortejo

	<i>D. buz. SL</i>	<i>D. buz. Carboneras</i>	<i>D. koepferae SL 8</i>	<i>D. koepferae SL 58</i>	<i>D. koepferae SL 88</i>	<i>D. koepferae PL</i>
Duración acoplamiento en segundos	140	80	100	85	150	180
	122	130	200	100	120	270
	120	120	95	100	150	180
	90	100	80	112	145	150
	110	130	150	110	130	290
	90	100	120	135	150	270
	90	103	122	120	210	300
	105	121	165	180	230	187
	90	90	140	185	230	200
	100	110		190	240	340
	126	100		220	250	300
	120	90		80	240	270
	115	115				270
	90	130				250
	95	100				230
	150	115				245
	45	90				230
	90	90				400
	90	118				200
	90	100				220
	105	100				300
	120	170				310
	135	60				
	125	100				
	90	105				
	95	108				
	100	110				
		127				
		135				
		85				
		100				
		90				
		70				
\bar{X}	105,11	105,82	130,22	134,75	187,08	254,18

Parejas que comienzan la cópula (tiempo en minutos)

	<10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	>90	no cop	Σ
<i>D. buz. SL</i>	11	10	9	2	2	3	1	0	3	2	7	50
<i>D. buz. Carboneras</i>	14	10	4	1	3	4	1	1	0	8	4	50
<i>D. koepferae SL 8</i>	2	2	1	1	0	1	1	0	0	6	36	50
<i>D. koepferae SL 58</i>	5	5	3	1	4	1	1	2	2	7	19	50
<i>D. koepferae SL 88</i>	7	5	1	0	1	1	0	0	0	18	18	51
<i>D. koepferae PL</i>	2	6	3	1	2	1	2	1	0	17	15	50
	41	38	21	6	12	11	6	4	5	58	99	301

Ratio sexual

Control	fragmento	♂♂	♀♀	Σ
	<i>D. koepferae SL</i>	280	314	594
	<i>D. buzzatii 4s/s</i>	254	251	505
	<i>D. buzzatii SL</i>	252	264	516
	<i>D. buzzatii SL white</i>	202	211	413
	Σ	988	1040	2028

Homocigotos	Temperatura ambiente (18-25°C)				Larvas		
	A1	119	140	259			
	A4-B3 (I)	202	294	496			
	A4-B3 (II)	216	204	420			
	C2-C3	294	273	567			
	D1-D5	248	143	391			
	E1-E5(W)	116	178	294			
	Σ	1195	1232	2427			
	Cámara de cría				♂♂	♀♀	Σ
	A1	152	145	297	59	96	155
	A4-B3 (I)	287	472	759	62	88	150
	A4-B3 (II)	242	278	520	73	77	150
	C2-C3	261	241	502	63	95	158
	D1-D5	319	183	502	85	49	134
	E1-E5(W)	165	254	419	59	91	150
	Σ	1426	1573	2999	401	496	897

Heterocigotos sencillos	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀				
	A1	D. buz. white	80	167	247	49	101	150
	A4-B3 (I)	D. buz. white	92	171	263	42	108	150
	A4-B3 (II)	D. buz. white	39	179	218	33	117	150
	C2-C3	D. buz. white	32	176	208	41	109	150
	D1-D5	D. buz. white	82	125	207	52	98	150
	E1-E5(W)	D. buz. white	79	121	200	55	95	150
	D. buz. white	A1	119	123	242	83	67	150
	D. buz. white	A4-B3 (I)	95	105	200	70	80	150
	D. buz. white	A4-B3 (II)	97	103	200	83	67	150
	D. buz. white	C2-C3	115	107	222	73	79	152
	D. buz. white	D1-D5	147	92	239	94	56	150
	D. buz. white	E1-E5(W)	89	111	200	82	68	150
		Σ	1066	1580	2646	757	1045	1802
	A1	D. buz. SL	128	102	230	58	92	150
	A4-B3 (I)	D. buz. SL	109	107	216	74	76	150
	A4-B3 (II)	D. buz. SL	95	107	202	86	64	150
	C2-C3	D. buz. SL	158	54	212	100	50	150
	D1-D5	D. buz. SL	123	96	219	89	61	150
	E1-E5(W)	D. buz. SL	103	106	209	64	86	150
	D. buz. SL	A1	100	106	206	56	94	150
	D. buz. SL	A4-B3 (I)	78	122	200	68	82	150
	D. buz. SL	A4-B3 (II)	126	123	249	76	74	150
	D. buz. SL	C2-C3	164	127	291	77	74	151
	D. buz. SL	D1-D5	97	121	218	70	80	150
	D. buz. SL	E1-E5(W)	81	122	203	54	96	150
	Σ	1362	1293	2655	872	929	1801	

Réplica 1					
Heterocigotos dobles trans	A4-B3 (I)	A4-B3 (II)	156	165	321
	A4-B3 (I)	C2-C3	273	274	547
	A4-B3 (I)	D1-D5	146	154	300
	A4-B3 (I)	E1-E5(W)	64	180	244
	A4-B3 (II)	A4-B3 (I)	165	225	390
	A4-B3 (II)	C2-C3	200	209	409
	A4-B3 (II)	D1-D5	140	109	249
	A4-B3 (II)	E1-E5(W)	10	36	46
	C2-C3	A4-B3 (I)	210	269	479
	C2-C3	A4-B3 (II)	192	222	414
	C2-C3	D1-D5	142	165	307
	C2-C3	E1-E5(W)	46	155	201
	D1-D5	A4-B3 (I)	158	168	326
	D1-D5	A4-B3 (II)	68	63	131
	D1-D5	C2-C3	98	57	155
	D1-D5	E1-E5(W)	50	85	135

E1-E5(W)	A4-B3 (I)	111	180	291
E1-E5(W)	A4-B3 (II)	129	176	305
E1-E5(W)	C2-C3	163	170	333
E1-E5(W)	D1-D5	112	149	261
Σ		2477	3046	5523

* A fecha de esta replica aún no se había obtenido el fragmento A1

Réplica 2					Larvas		
					♂♂	♀♀	Σ
A1	A4-B3 (I)	102	107	209	82	68	150
A1	A4-B3 (II)	103	138	241	64	86	150
A1	C2-C3	133	68	201	84	66	150
A1	D1-D5	107	94	201	93	57	150
A1	E1-E5(W)	69	131	200	46	104	150
A4-B3 (I)	A1	105	119	224	74	76	150
A4-B3 (I)	A4-B3 (II)	79	121	200	71	79	150
A4-B3 (I)	C2-C3	121	82	203	73	77	150
A4-B3 (I)	D1-D5	114	142	256	70	80	150
A4-B3 (I)	E1-E5(W)	82	203	285	41	109	150
A4-B3 (II)	A1	118	92	210	75	76	151
A4-B3 (II)	A4-B3 (I)	98	105	203	90	60	150
A4-B3 (II)	C2-C3	124	125	249	77	73	150
A4-B3 (II)	D1-D5	124	113	237	79	71	150
A4-B3 (II)	E1-E5(W)	58	180	238	55	95	150
C2-C3	A1	98	112	210	67	83	150
C2-C3	A4-B3 (I)	97	103	200	73	77	150
C2-C3	A4-B3 (II)	94	130	224	94	84	178
C2-C3	D1-D5	124	132	256	75	75	150
C2-C3	E1-E5(W)	71	177	248	43	107	150
D1-D5	A1	104	115	219	72	78	150
D1-D5	A4-B3 (I)	152	122	274	88	62	150
D1-D5	A4-B3 (II)	124	76	200	93	57	150
D1-D5	C2-C3	143	70	213	92	58	150
D1-D5	E1-E5(W)	83	121	204	65	85	150
E1-E5(W)	A1	104	110	214	79	71	150
E1-E5(W)	A4-B3 (I)	124	157	281	65	85	150
E1-E5(W)	A4-B3 (II)	78	126	204	67	83	150
E1-E5(W)	C2-C3	96	105	201	70	80	150
E1-E5(W)	D1-D5	82	118	200	91	59	150

Esterilidad

		24h	36h	48h	72h	96h	120h
Control	D. koep SL	n	50	47	42	27	5
		s*	0	3	5	4	1
		s	0	0	3	19	44
		50	50	50	50	50	
	D. buzi SL	n	42	2	7	1	1
		s*	2	7	14	2	1
		s	6	15	29	47	48
		50	24	50	50	50	
	Homocigotos y dobles heterocigotos trans : datos para análisis gráficos	C2-C3	n	31	14	0	0
			s*	5	7	0	0
s			14	29	50	24	
50			50	50	24		
D1-D5		n	34	31	6	7	
		s*	4	4	6	1	
		s	12	15	38	42	
		50	50	50	50		
E1-E5(W)		a	14	14	14	18	
		n	25	16	6	4	
	s*	3	7	0	0		
	s	8	13	30	28		
	50	50	50	50			
C2-C3xD1-D5	n	14	2	0	0		
	s*	6	0	0	0		
	s	30	48	50	50		
	50	50	50	50			
C2-C3xE1-E5(W)	n	24	0	0	0		
	s*	11	0	0	0		
	s	15	50	50	4		
	50	50	50	4			
D1-D5xE1-E5(W)	n	25	2	0	2		
	s*	6	7	0	0		
	s	19	41	50	18		
	50	50	50	20			

		24 h			48 h			72h			96 h				
♂♂	♀♀	s	s*	n	s	s*	n	s	s*	n	s	s*	n		
Dobles heterocigotos trans	A1	A4-B3 (I)		3	2	5	9	1	10		10			40	
	A1	A4-B3 (II)			1	9	8	2	0	9	1	10			40
	A1	C2-C3		4	2	4	8	1	1	10		10			40
	A1	D1-D5		3	1	6	8	2	10		10			40	
	A1	E1-E5(W)			3	7	8	1	1	10		10			40
	A4-B3 (I)	A1	2	3	5	9	1	10		10			40		
	A4-B3 (I)	A4-B3 (II)	1	2	7	4	2	4	7	2	1	5	2	3	40
	A4-B3 (I)	C2-C3	2	2	6	7	2	1	9	1		10			40
	A4-B3 (I)	D1-D5	3	3	4	9	1	10		10			40		
	A4-B3 (I)	E1-E5(W)	2	1	7	7	1	2	9	1		8	2		40
	A4-B3 (II)	A1	0	4	6	6	2	2	10		10			40	
	A4-B3 (II)	A4-B3 (I)	2	1	7	4	2	4	8	2	10		40		
	A4-B3 (II)	C2-C3	3	1	6	7	1	2	7	2	1	10			40
	A4-B3 (II)	D1-D5	3	1	6	7	1	2	10		10			40	
	A4-B3 (II)	E1-E5(W)	3	2	5	5	1	4	6	4	0	10	0		40
	C2-C3	A1	2	3	5	7	2	1	10		9			1	40
	C2-C3	A4-B3 (I)	2	3	5	10		10		10			40		
	C2-C3	A4-B3 (II)	0	1	9	8	2	8		2		10			40
	C2-C3	D1-D5	4	1	5	3	4	3	9	1	10		40		
	C2-C3	E1-E5(W)	3	2	5	6	2	2	10		10			40	
	D1-D5	A1	1	1	8	6	2	2	10		10			40	
	D1-D5	A4-B3 (I)	1	3	6	7	0	3	9	1	8		2	40	
	D1-D5	A4-B3 (II)	2	3	5	10		10		10			40		
	D1-D5	C2-C3	2	2	6	6	1	3	10		10			40	
	D1-D5	E1-E5(W)	3	2	5	5	1	4	9	1	9		1	40	
	E1-E5(W)	A1			2	8	9	1	10		10			40	
	E1-E5(W)	A4-B3 (I)	2	3	5	6	3	1	10		10			40	
	E1-E5(W)	A4-B3 (II)	10			4	2	4	6	3	1	10			40
	E1-E5(W)	C2-C3	10			8	1	1	8	2		10			40
	E1-E5(W)	D1-D5	1	4	5	10		10		10			40		
		54	59	187	211	42	47	272	16	10	283	2	9	1200	

Productividad

		Primer tubo(10 hembras)				Segundo tubo (nº hembras variable)						
		<i>Híbridos</i>		<i>D. buzzatii</i> SL w		<i>Híbridos</i>			<i>D. buzzatii</i> SL w			
Homocigotos	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♀♀ vivas	♂♂	♀♀	♀♀ vivas	♂♂	♀♀
	A1	A1	62	0	24	23	10	0	0	10	0	7
	ab1	ab1	2	1	31	47	7		5	7	5	1
	A4-B3(II)	A4-B3(II)	2	10	29	24	10	7	16	10	23	48
	c	c	8	13	14	21						
	d	d	2	7	37	51	3	3	8	3	11	4
	e	e	5	10	83	96	9		1	9	1	30
		81	41	218	262	10		30	40		90	
Heterocigotos dobles trans	A1	A1	62	0	24	23	10	0	0	10	0	7
	A1	ab1	33	44	15	39	9	3	2	9	5	0
	A1	A4-B3(II)		2	27	28	9	27	43	5	70	3
	A1	c	19	31	54	79	9	1	4	8	5	4
	A1	d	58	49	28	35	7	15	13	3	28	
	A1	e		49	31	28	9		3	8	3	32
	ab1	A1	6	4	19	29	4			7	0	8
	ab1	A4-B3(II)	9	11	32	32	9	6	11	10	17	41
	ab1	c					0					
	ab1	d	5	8	60	80	9		3	10	3	24
	ab1	e		3	42	32	9		1	5	1	32
	A4-B3(II)	A1	17	10	55	78	10		2	10	2	13
	A4-B3(II)	ab1	1	3	28	36	8	2	4	9	6	8
	A4-B3(II)	c	1	8	60	64	10		9	7	9	18
	A4-B3(II)	d	41	66	30	15	9	3	8	9	11	3
	A4-B3(II)	e		56	59	15	9		3	9	3	31
	c	A1	16	38	29	29	9	8	10	10	18	19
	c	ab1	16	35	16	24	6	1	1	4	2	10
	c	A4-B3(II)	52	48	5	8						
	c	d	12	7	2	4	10			10	0	5
	c	e		61	72	1	0					
	d	A1	17	17	13	15	7	63	61	6	124	1
	d	ab1	35	57	12	16	7	30	27	3	57	1
	d	A4-B3(II)	11	26	22	45	9	19	24	8	43	1
	d	c	48	71	14	20	9			9	0	16
	d	e		45	45	36	10			10		6
	e	A1		1	67	78	0					
	e	ab1	4	5	28	33	7	9	13	8	22	
	e	A4-B3(II)	4	6	34	66	10	7	11	10	18	6
	e	c	10	8	91	104	8			8	0	2
	e	d	11	12	29	36	10			10	0	
		488	781	1043	1128	194		253	447		291	

Heterocigotos sencillos	<i>A1</i>	<i>DbSL</i>	22	22	33	50	6	39	41	8	80	25
	<i>ab1</i>	<i>DbSL</i>	39	49	63	58	10	2	1	10	3	24
	<i>A4-B3(II)</i>	<i>DbSL</i>	40	55	19	23	10	14	24	10	38	4
	<i>c</i>	<i>DbSL</i>	7	10	37	55	9	4	2	9	6	0
	<i>d</i>	<i>DbSL</i>	17	21	14	35	8	49	49	7	98	6
	<i>e</i>	<i>bw</i>	5	19	30	43						
	<i>DbSL</i>	<i>A1</i>	24	58	3		3		5	10	5	
	<i>DbSL</i>	<i>ab1</i>	34	49	12	25	8			10	0	10
	<i>DbSL</i>	<i>A4-B3(II)</i>	15	21	98	80	10		1	10	1	
	<i>DbSL</i>	<i>c</i>	58	72	7	11	10	9	22	10	31	5
	<i>DbSL</i>	<i>d</i>	20	31	70	69	10	9	18	10	27	29
	<i>DbSL</i>	<i>e</i>		11		6	4		1	6		21
			294	418	391	455		126	164		290	124

Replicas											
Primer tubo(10 hembras)						Segundo tubo (n° hembras variable)					
		Híbridos		<i>D. buzzatii</i> SL (<i>w</i>)		Híbridos		<i>D. buzzatii</i> SL (<i>w</i>)			
♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♀♀ vivas	♂♂	♀♀	♀♀ vivas	♂♂	♀♀
<i>A1</i>	<i>A1</i>	13	5	18	12	6	2	5	3	3	6
<i>A1</i>	<i>A1</i>		4	4	10	8	22	21	8	1	1
<i>ab1</i>	<i>ab1</i>	9	10	19	26						
<i>ab1</i>	<i>ab1</i>	3	5	8	20						
<i>A4-B3(II)</i>	<i>A4-B3(II)</i>	6	9	15	12						
<i>A4-B3(II)</i>	<i>A4-B3(II)</i>	7	9	10	30	7	4	6	4		
<i>c</i>	<i>c</i>	28	15	43	27	8			6	7	7
<i>c</i>	<i>c</i>	9	12	21	10						
<i>c</i>	<i>c</i>	6	7	13	12	10			10	1	
<i>d</i>	<i>d</i>	4	3	7		10	35	37	10		
<i>d</i>	<i>d</i>	32	33	65	5						
<i>d</i>	<i>d</i>	34	22	56	22	7	50	48	2	5	7
<i>e</i>	<i>e</i>	5	7	12	15						
<i>e</i>	<i>e</i>	3	6	9	35	6	1		8	4	13
<i>e</i>	<i>e</i>			0	60	7			9	22	33

<i>A1</i>	<i>DbSL</i>	110	64	174	17	9	73	79	9		
<i>A1</i>	<i>DbSL</i>	50	71	121		9	34	39	9		
<i>ab1</i>	<i>DbSL</i>	51	77	128	13	7	2	13	4		3
<i>ab1</i>	<i>DbSL</i>	15	23	38		10	9	12	10		
<i>A4-B3(II)</i>	<i>DbSL</i>	60	67	127	6						
<i>A4-B3(II)</i>	<i>DbSL</i>										
<i>DbSL</i>	<i>A1</i>	6	9	15	10						
<i>DbSL</i>	<i>A1</i>	50	73	123		10	86	55	7		
<i>DbSL</i>	<i>ab1</i>										
<i>DbSL</i>	<i>A4-B3(II)</i>	26	48	74	20	10	11	13	10	71	81
<i>DbSL</i>	<i>c</i>	13	27	40	13	8			9	20	11
<i>DbSL</i>	<i>d</i>			0							
<i>bw</i>	<i>e</i>	15	14	29	35						
<i>bw</i>	<i>e</i>			0	71	10			10	19	20
<i>c</i>	<i>DbSL</i>	5	7	12		9	59	63	10		
<i>d</i>	<i>DbSL</i>	24	31	55	17	10	65	55	10	4	14
<i>e</i>	<i>bw</i>				59	8			8	5	7
<i>e</i>	<i>bw</i>	10	10	20	12	10		5			

Alteraciones del desarrollo

Se muestran las líneas que si mostraron alguna alteración del desarrollo

fragmento	Individuos con alteración			total individuos
	♂♂	♀♀	Σ	
<i>D. koepferae</i> SL	0	0	0	250
<i>D. buzzatii</i> SL	0	0	0	250
Σ	0	0	0	

Cámara de cría

Homocigotos	A1	6	2	8	332
	A4-B3 (I)	2	2	4	230
	A4-B3 (II)	3	9	12	293
	C2-C3	4	1	5	236
	E1-E5(W)	4	7	11	191
	Σ	19	21	40	1282
	Temperatura ambiente (18-25°C)				
	A1	2	2	4	136
	A4-B3 (I)	3	1	4	204
	A4-B3 (II)	2	0	2	203
	C2-C3	2	0	2	149
	E1-E5(W)	2	2	4	210
	Σ	11	5	16	902

Heterocigotos sencillos	A1	<i>D. buz. white</i>	1	0	1	247
	A4-B3 (II)	<i>D. buz. white</i>	1	0	1	218
	<i>D. buz. white</i>	A1	1	0	1	248
	A1	<i>D. buz. SL</i>	3	0	3	601
	C2-C3	<i>D. buz. SL</i>	1	0	1	230
	Σ		7	0	7	1544

Heterocigotos dobles trans	<i>A1</i>	<i>A4-B3(I)</i>	4	1	5	113
	<i>A1</i>	<i>A4-B3(II)</i>	5	3	8	299
	<i>A1</i>	<i>C2-C3</i>	0	0	0	39
	<i>A1</i>	<i>E1-E5(W)</i>	3	0	3	98
	<i>A4-B3(I)</i>	<i>A1</i>	0	0	0	98
	<i>A4-B3(I)</i>	<i>A4-B3(II)</i>	1	1	2	110
	<i>A4-B3(I)</i>	<i>C2-C3</i>	2	2	4	122
	<i>A4-B3(I)</i>	<i>E1-E5(W)</i>	0	1	1	148
	<i>A4-B3(II)</i>	<i>A1</i>	2	0	2	157
	<i>A4-B3(II)</i>	<i>A4-B3(I)</i>	0	1	1	46
	<i>A4-B3(II)</i>	<i>C2-C3</i>	1	3	4	45
	<i>A4-B3(II)</i>	<i>E1-E5(W)</i>	0	0	0	42
	<i>C2-C3</i>	<i>A1</i>	2	1	3	112
	<i>C2-C3</i>	<i>A4-B3(I)</i>	4	4	8	121
	<i>C2-C3</i>	<i>A4-B3(II)</i>	2	3	5	173
	<i>C2-C3</i>	<i>E1-E5(W)</i>	1	0	1	94
	<i>E1-E5(W)</i>	<i>A1</i>	1	0	1	83
	<i>E1-E5(W)</i>	<i>A4-B3(I)</i>	0	2	2	86
	<i>E1-E5(W)</i>	<i>A4-B3(II)</i>	10	4	14	247
	<i>E1-E5(W)</i>	<i>C2-C3</i>	0	1	1	15
Σ			38	27	65	2248

